



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Desarrollo de resistencia a la insulina hipocampal posterior a la ingesta de una dieta alta en grasa y fructosa y su asociación con alteraciones estructurales y funcionales en esta región

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:
LIBB ERIKA CALVO OCHOA**

**Tutora principal:
Dra. Clorinda Arias Álvarez
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Miembros del comité tutor:
Dra. Lourdes Massieu Trigo - Instituto de Fisiología Celular
Dr. Ignacio Camacho Arroyo – Facultad de Química**

México, D.F., Septiembre del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia. Las palabras nunca serán suficientes para agradecerles **su amor** y apoyo incondicionales. **Gracias** por ayudarme a cumplir mi sueño de estudiar los extraordinarios secretos de las células y de obtener un doctorado. Sin ustedes no hubiera sido posible.

A mi esposo **Pablo**,

Por tu inagotable amor y paciencia en todos estos años. Por **ser mi** ejemplo, mi soporte y mi compañero de vida. Esta tesis es un logro compartido. Gracias por construir conmigo una vida y una familia maravillosa. Emma y **tú** son los amores de mi vida.

A mi preciosa hija Emma,

Por darme el privilegio de ser tu mamá, y por enseñarme tanto. Llenas nuestras vidas de amor, de inocencia y de magia. **Gracias** por inspirarme a hacer mejor las cosas. Ser tu mamá **es** la labor más significativa y dichosa de mi vida.

A mis papás Javier y Patricia,

Por su incansable esfuerzo y sus constantes sacrificios. No puedo más que agradecerles todo lo que hicieron siempre por nuestra familia, y todo lo que nos dieron a mi hermana y a mí. Gracias a ustedes me convertí en la persona que soy **hoy**.

A mi hermana Ingrid,

Por ser mi primera compañera y por ser mi mejor amiga. Porque a pesar de la distancia estamos siempre conectadas y siempre lo seguiremos estando. Gracias por todos los momentos lindos que hemos pasado juntas a lo largo de nuestra vida y por tu apoyo.

Agradecimientos

A la Dra. Clorinda Arias, por ser una excelente tutora, maestra y persona, de la cual he aprendido tanto. Gracias por haberme abierto las puertas de su laboratorio con plena confianza para desarrollar con libertad este proyecto de doctorado, lo que me hizo crecer como estudiante y como persona. Gracias por su comprensión y apoyo en las cuestiones personales. Es un orgullo haber sido su estudiante y haber podido trabajar en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutor: la Dra. Lourdes Massieu y el Dr. Ignacio Camacho por enriquecer mi proyecto de doctorado con sus comentarios, consejos, reactivos y oportunidades para mi desarrollo profesional. Agradezco mucho su tiempo y su disposición.

A los miembros del jurado de examen de grado: la Dra. Marcia Hiriart, la Dra. Cristina Fernández, el Dr. Rudolf Buijs y el Dr. Federico Bermúdez por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, y por sus comentarios que la enriquecieron.

A la QFB Patricia Ferrera, por su excelente ayuda técnica y por mantener el laboratorio en condiciones óptimas para que todos trabajemos, así como por ser el alma del laboratorio y organizar todos los cumpleaños. Gracias por las pláticas mañaneras que hacían que el día siempre comenzará bien.

A la Dra. Angélica Zepeda por todas las pláticas que compartimos, y por siempre tener tiempo para compartir experiencias y consejos.

A mis compañeros del laboratorio pasados y presentes, por hacer del laboratorio un lugar lindo y cordial para ir a trabajar. Por las pláticas, el café y por todos los momentos y éxitos (con sus correspondientes pasteles) que compartimos.

A Ceci Gómez por colaborar conmigo en este proyecto, por todo tu esfuerzo, dedicación y trabajo. No pude haber tenido una mejor alumna, colaboradora y amiga. Muchas gracias por compartir tu incansable entusiasmo de aprenderlo todo y por toda tu paciencia.

A mis tutores de la LIBB: el Dr. Enrique Ortega, el Dr. René Drucker, la Dra. Imelda López y el Dr. Adolfo García-Sáinz por contribuir de forma invaluable a mi formación científica durante mi licenciatura, al permitirme formar parte de sus laboratorios.

To Dr. Bryen Jordan of Albert Einstein College of Medicine, for giving me an once-in-a-lifetime opportunity to be a member of his new lab. Thanks for all the trust, support and for being a wonderful mentor; I learned a great deal from you. Thanks also to Dr. Svetlana Cvejic and to my fellow labmates at Dr. Jordan's lab for making it a great place to work.

Al Dr. Roger Gutiérrez-Juárez y a la Dra. Isabel Arrieta-Cruz del Albert Einstein College of Medicine por su apoyo para el uso del modelo de las dietas altas en grasa.

A mis queridos amigos: Alejandro, Aliesha, Brenda, Ceci, Jean, José y Vale. Gracias por estos años de compartir juntos. Sé que a pesar de la distancia, seguirán siendo muchos más. To my dear New York friends Dana and Ohad.

A mis tíos y primos del DF: Memo, Heidi y Montse; Fabas, Memo y Tía Lupita. Gracias por su apoyo, por acompañarnos y compartir tanto con nosotros durante todos estos años.

Un agradecimiento especial a Ceci y José por ayudarme con mis trámites de titulación con la mejor disposición. No sé que hubiera hecho sin su ayuda.

Al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas y del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por su apoyo para la realización de este trabajo. En especial a Azucena Ayala Pichardo, que me ha acompañado en mis trámites académicos desde la licenciatura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención obtenida para mis estudios de doctorado (232879). Al CONACyT y al PAPIIT por el financiamiento obtenido para la realización de este proyecto (166482 e IN204212, respectivamente).

A mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias querida Universidad por toda mi formación académica y por darme el honor de pertenecer a tus graduados.

Índice

Índice	1
Resumen	3
Abstract	5
Abreviaturas	6
Organización de la tesis	9
Introducción	11
Deterioro cognitivo	12
Demencia	12
Enfermedad de Alzheimer	12
Obesidad	13
Resistencia a la insulina sistémica	14
Dietas altas en grasas y desarrollo de trastornos metabólicos	14
La insulina	16
La vía de señalización de la insulina: RI/IRS-1/PI3-K/Akt	16
El papel de la insulina en el cerebro	19
El papel de la insulina en el hipocampo	20
Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina celular asociados a la obesidad	21
Absorción de grasas presentes en la dieta y captura de ácidos grasos por las células	22
Dietas altas en grasa y aumento de la concentración de ácidos grasos libres en suero	22
Lipotoxicidad y resistencia a la insulina: papel del ácido palmítico	23
Dietas altas en grasas y la vía de mTOR/S6K	25
Inflamación	26
Antecedentes.....	28
Planteamiento del problema	42
Hipótesis	43

Objetivos	43
Materiales y métodos	44
Resultados I. Modelo <i>in vivo</i> de administración subaguda de dietas altas en grasa y fructosa en ratas	48
Artículo publicado	68
Resultados II. Modelo <i>in vitro</i> de administración subaguda y aguda de ácidos grasos en células de neuroblastoma	76
Objetivos II	77
Materiales y métodos II	78
Discusión	88
Conclusiones	102
Referencias	104

Resumen

El consumo de dietas altas en grasas saturadas y azúcares, en particular la fructosa (high-fat-and-fructose-diets, HFFD), promueve el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2. Algunas de estos padecimientos se han asociado como condiciones de riesgo epidemiológico para padecer varias enfermedades, dentro de las cuales se encuentran los déficits cognitivos y demencias, incluida la Enfermedad de Alzheimer. En modelos animales la ingesta crónica de dietas altas en grasas y fructosa promueve un desempeño deficiente en tareas de memoria y aprendizaje, asociado a una reducción de la síntesis de factores neurotróficos, del establecimiento de potenciación a largo plazo y de la neurogénesis en el giro dentado. Sin embargo, hasta el momento no se conocen los efectos de una ingesta de una dieta alta en grasa y fructosa a corto plazo en el hipocampo, región de gran plasticidad responsable de funciones cognitivas, y que presenta gran vulnerabilidad para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que la insulina juega un papel fundamental en procesos de memoria y aprendizaje, así como en el establecimiento de la potenciación a largo plazo que subyace a éstos procesos cognitivos. Dado el papel fundamental de la insulina en las neuronas hipocampales, se podría especular que alteraciones en la sensibilidad a la insulina en esta región, secundarias a resistencia a la insulina periférica, podrían relacionarse con alteraciones neuronales y con déficits cognitivos. Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar si la ingesta subaguda de una dieta alta en grasas y fructosa, induce resistencia a la insulina sistémica y en el hipocampo, y si estos cambios en la sensibilidad a la insulina hipocampal se asocian con alteraciones estructurales y funcionales en esta región. Nuestros hallazgos muestran que el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa por siete días induce incremento del peso corporal y resistencia a la insulina sistémica; asociados con las siguientes alteraciones hipocampales: disminución de la sensibilidad a la insulina y activación de la vía de mTOR/S6K; disfunción mitocondrial sináptica; disminución del peso del hipocampo y de la complejidad del árbol dendrítico neuronal; reducción de marcadores sinápticos; alteraciones en proteínas asociadas a microtúbulos dendríticas y axónicas y procesos de neuroinflamación.

Adicionalmente, para tratar de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de estas alteraciones neuronales en el modelo *in vivo*, desarrollamos un modelo de exposición a dietas altas en grasas *in vitro* utilizando cultivos de neuroblastoma expuestos al ácido palmítico, el cual es el ácido graso saturado más abundante en la dieta HFFD. En este modelo encontramos que la exposición aguda al ácido palmítico produce una disminución de la sensibilidad de la insulina neuronal, y que la exposición sub-aguda promueve una disminución en la actividad mitocondrial inducida por insulina, mediada por las vías de señalización de PI3K y mTOR/S6K. De esta manera, planteamos dos modelos experimentales para estudiar cómo cambios metabólicos sistémicos modifican la repuesta neuronal a la insulina que pueden repercutir en modificaciones de la plasticidad neuronal y explicar la relación que existe entre obesidad y resistencia a insulina como factores de riesgo para el desarrollo de alteraciones cognitivas y de un envejecimiento cerebral prematuro. Este estudio permitirá el desarrollo de nuevos blancos para el tratamiento y prevención del deterioro cognitivo en poblaciones vulnerables tales como el grupo clínico creciente de pacientes con enfermedades metabólicas y crónico-degenerativas.

Abstract

Chronic consumption of high-fat and high-fructose diets (HFFD) cause metabolic disorders including: obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and type-2 diabetes mellitus. These diseases have been associated with the development of cognitive decline, dementia and Alzheimer's Disease in epidemiological studies. In animal models, long-term high-fat and high-fructose diets intake promotes a deficient execution in memory and learning tasks, associated with neuronal changes such as reduced number and complexity of dendritic spines, altered establishment of long-term potentiation and long-term depression, and diminished dentate gyrus neurogenesis. However, the short-term high-fat and high-fructose diet feeding effect on the hippocampus has not been yet investigated. The hippocampus is a highly plastic brain region, responsible for cognitive and learning tasks, and presents a particular vulnerability to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease. It has been shown that insulin plays a pivotal role in memory and learning processes, facilitating the establishment of hippocampal long term potentiation required for such tasks. Given insulin's important role in cognition in hippocampal neurons, it could be speculated that changes in insulin sensitivity within the hippocampus, that are associated with insulin systemic changes produced by metabolic alterations, could be associated with neuronal alteration and cognitive impairment. Therefore, we investigated if short-term high-fat and high-fructose diet produces systemic and hippocampal insulin resistance and if the latter is associated with structural and functional alterations in this region. Our results show that high-fat and high-fructose diet feeding for seven days induces obesity and systemic insulin resistance, along the following alterations in the hippocampus: decreased insulin sensitivity along increased mTOR/S6K signaling; synaptic mitochondrial dysfunction; reduction on hippocampal weight associated with a reduction in neuronal dendritic arborization; reduced synaptic markers; alterations in dendritic and axonal microtubule-associated proteins and neuroinflammation. Additionally, to shed light on the molecular mechanisms responsible of some of the neuronal alterations obtained in the *in vivo* model, we developed a model of high-fat exposure *in vitro* using neuroblastoma cell cultures treated with palmitic acid, the most abundant saturated fatty acid in the high-fat

diet given to rats in this study. In this model we found that acute treatment with palmitic acid produces a decreased insulin sensitivity in neurons, and that sub-acute palmitic acid treatment promotes a diminished insulin-mediated mitochondrial activity, through PI3K and mTOR/S6K signaling cascades. In this fashion, we present two experimental models to study how systemic metabolic changes can modify neuronal responses to insulin and therefore alter insulin-mediated neuronal plasticity. This study will assist to study further the relationship between obesity and systemic insulin resistance with the development of cognitive impairment and premature brain aging.

Abreviaturas

- HFFD – High-fat and high-fructose diet (dieta alta en grasa y fructosa)
- DMT2 – Diabetes Mellitus tipo 2
- EA – Enfermedad de Alzheimer
- LTP – Long term potentiation (potenciación a largo plazo)
- AP – Ácido palmítico
- AD – Alzheimer's Disease
- PA – Palmitic acid
- OMS – Organización Mundial de la Salud
- MCI – Mild Cognitive Impairment (deterioro cognitivo leve)
- IMC – Índice de masa corporal
- RI – Receptor de insulina
- PTB – Phosphotyrosine-binding domain (dominio de unión a fosfotirosina)
- IRS – Insulin receptor substrate (sustrato del receptor a insulina)
- PI3-K - fosfatidil-inositol-3-cinasa
- PIP₂ – fosfatidilinositol-4,5-difosfato
- PIP₃ – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
- PDK1 – Phosphoinositide-dependent kinase 1 (cinasa dependiente de fosfoinosítidos)
- GSK3 β – Glucogen synthase kinase 3 β (cinasa de la sintasa de glucógeno 3 β)
- SNC – Sistema nervioso central
- POMC – pro-opiomelancortina (POMC)
- AgRP – Agouti-related peptide (péptido relacionado con Agouti)
- mTOR – Mammalian target of rapamycin (blanco de la rapamicina en mamíferos)
- AMPK – AMP-activated kinase (cinasa activada por AMP)
- ATP – Adenosintrifosfato
- ADP – Adenosindifosfato
- AMP – Adenosinmonofosfato
- FABP – Fatty acid-binding proteins (proteínas de unión a ácidos grasos)
- GPCR – G protein-coupled receptor (receptor acoplado a proteínas G)

PKC – Protein kinase C (proteína cinasa C)

DAG – diacilglicerol

TNF- α – Tumor necrosis factor α (Factor de necrosis tumoral α)

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 – Interleucina 1

JNK – c-Jun NH₂-terminal kinase (cinasa del extremo amino terminal de c-Jun)

MTT – bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MAP-2 – Microtubule associated protein 2 (proteína asociada a microtúbulos)

GFAP – Glial fibrillary acidic protein (proteína fibrilar ácida glial)

BDNF – Brain-derived growth factor (factor de crecimiento derivado del cerebro)

EROs – Especies reactivas de oxígeno

Organización de la tesis

Este trabajo está dividido en once secciones: Introducción, Antecedentes, Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos, Materiales y métodos, Resultados I, Resultados II, Objetivos II, Materiales y métodos II, Discusión y Conclusiones.

En la introducción se presenta un marco teórico general sobre dos grupos de enfermedades relacionadas en las que se basa la investigación de este trabajo de tesis: deterioro cognitivo, demencias y Enfermedad de Alzheimer, y por otro lado obesidad y resistencia a la insulina. Adicionalmente se presenta información sobre la vía de señalización de la insulina y su relevancia en el hipocampo, la principal zona cerebral de estudio de nuestro grupo de investigación y de este trabajo de tesis. Finalmente, se describen los principales mecanismos moleculares de resistencia a la insulina asociados a la obesidad.

Enseguida, en la sección de Antecedentes se presenta una revisión integral de: 1) los mecanismos moleculares detrás de la función de la insulina en el hipocampo y su papel en el establecimiento de memoria y aprendizaje; 2) la relación entre el padecimiento de trastornos metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina con deterioro cognitivo, demencias y Enfermedad de Alzheimer; 3) mecanismos moleculares y celulares reportados en diversos modelos de enfermedades metabólicas y disfunción cognitiva; en particular, el uso de dietas altas en grasa como modelo de obesidad y resistencia a la insulina y sus efectos sobre la memoria y el aprendizaje. Esta revisión corresponde a la publicación *“Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signaling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer’s disease. Animal models of study”*.

A continuación se presenta el planteamiento del problema así como la hipótesis, objetivos y materiales y métodos. Posteriormente, en Resultados I se muestran los efectos de la administración subaguda de dietas altas en grasa y fructosa en ratas sobre el hipocampo a nivel bioquímico, morfológico y estructural, y que corresponde a la publicación

“Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations, dendritic and synaptic loss and astroglial response in the rat hippocampus”.

Posteriormente, en Resultados II se presenta el desarrollo de un modelo de resistencia a la insulina neuronal *in vitro* por administración aguda y subaguda de ácidos grasos saturados, mediante el cual se pueden estudiar los mecanismos moleculares asociados a las alteraciones neuronales de forma aislada. Estos resultados son parte de un manuscrito en preparación titulado *“Saturated fatty acids induce neuronal insulin resistance and mitochondrial dysfunction in isolated synapses and in vitro: role of mTOR/S6K”*. Esta sección es seguida de sus correspondientes Objetivos y Materiales y métodos.

Finalmente, se presenta una discusión integral de los hallazgos del presente trabajo, así como dos modelos integrativos para los resultados obtenidos en los modelos *in vivo* e *in vitro*. Adicionalmente se presentan las conclusiones generales de esta tesis doctoral.

Introducción

La ingesta de dietas altas en grasas saturadas y azúcares aunado a un estilo de vida sedentario ha incrementado de forma alarmante durante los últimos años en las sociedades occidentales. La alta ingesta calórica promueve el desarrollo de alteraciones metabólicas como: obesidad, resistencia a la insulina sistémica, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (Kraegen et al. 1991; Elliott et al. 2002; Shapiro et al. 2008; Bocarsly et al. 2010). Estas enfermedades metabólicas han alcanzado proporciones epidémicas e incrementan el riesgo a padecer otras enfermedades que en conjunto limitan de forma dramática la calidad y esperanza de vida (Klein et al. 2004; Allison et al. 2008). Dentro de estas enfermedades y padecimientos se encuentran las alteraciones cognitivas, incluyendo las demencias y la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Craft S., 2007; Viscogliosi et al., 2009; Umegaki et al., 2010; Schrijvers et al., 2010; Matsuzaki et al., 2010).

Al mismo tiempo, la expectativa de vida ha aumentado de forma considerable. Este aumento en la longevidad ha traído como consecuencia un incremento en la aparición de enfermedades crónico-degenerativas asociadas a la edad, dentro de las cuales se unas de las más importantes y que comprenden el mayor impacto económico y social se encuentran también las demencias y la Enfermedad de Alzheimer. México actualmente enfrenta estas dos condiciones poblacionales, ya que por un lado ocupamos el primer lugar mundial en obesidad mundial y por otro, nuestra población se está volviendo más longeva (OMS, 2013; Olaiz-Fernandez et al. 2006). Es por ello que es fundamental el estudio de la relación que existe entre el desarrollo de enfermedades metabólicas y padecimientos neurodegenerativos, para poder desarrollar enfoques preventivos y farmacológicos más efectivos e integrales en el futuro.

Deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo leve (MCI por mild cognitive impairment) es un padecimiento en el que los individuos presentan alteraciones de la memoria y de algunas funciones cognitivas, mayores a las esperadas por el envejecimiento normal, sin que éstas representen un impacto significativo en su vida diaria (Petersen et al. 1999; Grundman et al. 2004; Feldman et al. 2003). Los pacientes que presentan deterioro cognitivo leve tienen un mayor riesgo de presentar algún tipo de demencia, en particular la EA (Morris et al. 2001; Tabert et al. 2006).

Demencia

Se conoce como demencia a una categoría de enfermedades neurodegenerativas, progresivas e irreversibles que llevan a una pérdida significativa de la memoria y de las funciones cognitivas. Adicionalmente pueden presentarse también alteraciones del estado de ánimo, la personalidad, del sueño y del lenguaje, lo que en conjunto impacta de manera significativa la vida diaria de los individuos que presentan estas enfermedades y de sus familias. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que alrededor de 35 millones de personas presentan demencia en el mundo y se predice que para el 2030 el total puede llegar a 70 millones. Existen varios sub-tipos de demencia, las más comunes son: EA, demencia vascular, demencia mixta, demencia con cuerpos de Lewis y demencia frontotemporal (Hort et al. 2010; Feldman et al. 2003; McKhann et al. 2011; Galvin et al. 2012).

Enfermedad de Alzheimer

La EA es el tipo más común de demencia (~70% de los casos) y su principal factor de riesgo es el envejecimiento. Su prevalencia es del 40% en personas mayores a 85 años y alrededor de 20 millones de personas a nivel mundial la padecen. Durante las primeras etapas de la enfermedad se presenta una pérdida de la memoria a corto plazo y una desorientación

espacio temporal, seguida de afectaciones cognitivas más severas como: afasia, alteraciones generalizadas de la memoria y pérdida del juicio. Estos cambios son normalmente acompañados o precedidos por irritabilidad, depresión, ansiedad y cambios en la personalidad. Finalmente, en las últimas etapas de la enfermedad el deterioro cognitivo es tal que el paciente pierde la capacidad para hablar, reconocer personas, objetos y lugares, por lo que se vuelve totalmente dependiente (Hebert et al. 2003).

A nivel histopatológico la EA se caracteriza por una neurodegeneración crónica de áreas cerebrales de alta plasticidad, como el hipocampo, la corteza cerebral y la corteza entorrinal, que comienza con una pérdida generalizada de las sinapsis y un hipometabolismo neuronal (Davies et al. 1987; Selkoe et al. 2002; Arias et al. 2002). Adicionalmente, se observan la presencia de dos marcadores histopatológicos característicos: las placas amiloideas, compuestas de péptido β A insoluble extracelular; y las marañas neurofibrilares formadas de agregados intracelulares insolubles de tau hiperfosforilada. La presencia de estos factores en conjunto promueven la pérdida sináptica y posterior muerte neuronal asociada a la pérdida de la memoria y las funciones cognitivas que son características de la EA (Mungarro-Menchaca et al. 2002; Selkoe et al. 2002; Lacor et al. 2007; Small et al. 2004).

Obesidad

La obesidad es un trastorno metabólico crónico que se caracteriza por una acumulación de grasa corporal excesiva, resultante del desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Su definición clínica toma en cuenta la masa corporal y la estatura del individuo (kg/m^2) en un parámetro conocido como índice de masa corporal (IMC). Un IMC mayor a 30 se considera obesidad (Mei et al. 2002; Dietz et al. 2004). Datos de la OMS apuntan a que más de 300 millones de personas a nivel mundial padecen obesidad, siendo México el país con mayor presencia de esta condición en adultos y niños, con una prevalencia mayor al 30% de la población (Olaiz-Fernandez et al. 2006). La presencia de obesidad aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 y otros trastornos metabólicos.

Resistencia a la insulina sistémica

Se conoce como resistencia a la insulina a la disminución de la señalización de insulina en células, tejidos u órganos. Cuando se presenta en el hígado, músculo y tejido adiposo, se convierte en un trastorno metabólico caracterizado por una disminución de los efectos metabólicos de la insulina y se conoce como resistencia a la insulina sistémica (Samuel et al. 2001; Zick, 2004; Wang et al. 2005). Esto trae como consecuencia una ligera hiperglucemia la cual ocasiona la sobreproducción de insulina. Generalmente estas alteraciones se acompañan de dislipidemia (Samuel et al., 2004; Um et al., 2006; Savage et al., 2007). A medida que el síndrome de resistencia a la insulina progresa, se observa un aumento gradual en la producción de insulina. Si este trastorno continúa, en algunos casos, las células β -pancreáticas comienzan a disminuir la producción de insulina debido a lipotoxicidad, glucotoxicidad o inflamación. Lo anterior promueve la elevación de los niveles sanguíneos de glucosa y el establecimiento de diabetes mellitus de tipo 2 (Weir et al. 2001).

Dietas altas en grasa y desarrollo de trastornos metabólicos

El consumo de dietas altas en grasas y azúcares, particularmente grasas saturadas y fructosa, componentes abundantes en la dieta occidental, produce un incremento en la adiposidad visceral, así como de los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre, lo que promueve el desarrollo de obesidad y de una reducción a la sensibilidad a la insulina. La obesidad y la resistencia a la insulina forman también parte de otro padecimiento llamado síndrome metabólico, el cual puede presentar adicionalmente: hipertensión, hipercolesterolemia, dislipidemia e hiperuricemia (Lind et al., 1992; Meigs et al., 2000). El síndrome metabólico además representa un estado pro-trombótico y pro-inflamatorio y está altamente asociado al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cáncer (Larqué et al. 2011).

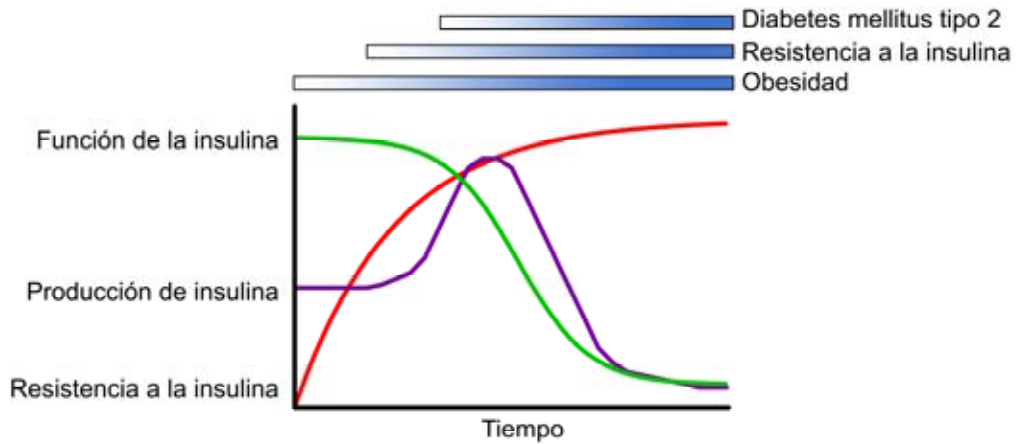


Figura 1. Relación entre la producción, la resistencia y la función de la insulina y el desarrollo de trastornos metabólicos. El esquema representa la creciente resistencia a la insulina a lo largo del tiempo, así como su relación con la aparición de trastornos como el síndrome de resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. La producción de insulina aumenta cuando la función de ésta disminuye, hasta que se alcanza un pico máximo de producción. En algunos casos, esta producción se detiene por daño a las células β pancreáticas, lo que produce una caída en la producción de insulina y el desarrollo y progreso de diabetes mellitus tipo 2 (Erika Calvo-Ochoa, 2015).

A pesar de que la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 son enfermedades distintas, comparten muchos de sus marcadores fisiopatológicos y algunas de ellas usualmente se presentan juntas. Estas enfermedades metabólicas pueden ser entendidas como un continuum, donde el balance entre la resistencia a la insulina y la producción de insulina determina las características patológicas y da como resultado el desarrollo de alguna de estas enfermedades (Figura 1).

La insulina

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos producido en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Se libera al torrente sanguíneo en respuesta a altas concentraciones de glucosa en sangre. Sus efectos metabólicos más importantes son el aumento de: la captación de glucosa en la mayoría de las células del organismo, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo y la lipogénesis en tejido adiposo y la síntesis de proteínas en las células de todos los tejidos. La captación de la glucosa por las células debida a la acción de la insulina provoca una disminución en la concentración de glucosa en sangre hasta alcanzar los niveles fisiológicos (Klip y Paquet, 1990; Sonsksen y Sonsksen, 2000; Dimitriadis et al. 2011).

La insulina es considerada la hormona anabólica más importante y además de regular la homeostasis de la glucosa, tiene funciones de factor de crecimiento (Laron, 2008; Boucher et al. 2010).

La vía de señalización de la insulina: RI/IRS-1/PI3-K/Akt

La vía de señalización de insulina se comparte en todas las células del organismo. Sin embargo, las consecuencias funcionales de la activación de esta vía son diferentes en cada tipo celular. El receptor de insulina (RI) es un receptor transmembranal con actividad de tirosina cinasa que se autofosforila debido a la unión del ligando. Esta fosforilación recluta a dos proteínas con dominios de unión a fosfotirosinas (PTB) que activan dos vías de señalización independientes: la de PI3-K/Akt y la de RAS/ERK. En la primera de ellas, el principal transductor de la señal es el sustrato del receptor de insulina (IRS 1-6), una familia de seis proteínas, cuyas funciones no son redundantes. IRS-1 e IRS-2 se expresan de manera ubicua y son las principales mediadoras de la señalización de insulina, en ese orden. Las proteínas IRS-3-6 se expresan en tejidos específicos y su función aún no queda del todo clara (White, 2002; Bjornholm et al. 2002; Cai et al. 2003; Fritsche et al. 2008).

Al unirse a las fosfotirosinas del receptor de insulina, el IRS-1 se autofosforila en residuos de tirosina. Estos sitios fosforilados son entonces reconocidos por la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3-K), la cual fosforila al inositol-3,4,5-difosfato (PIP₂) membranar para producir inositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). El PIP₃ funciona como segundo mensajero para la reclutación y activación de la cinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos 1 (PDK1), la cual fosforila y activa al principal efector de la vía de la insulina, la cinasa Akt (Figura 2) (Rosen, 1986; White et al. 1988; De Camilli et al. 1996; Bjornholm y Zierath, 2005; Zhao y Vogt, 2008; Cheng et al. 2010).

La enzima Akt es una cinasa de serina/treonina activada tanto por insulina como por diferentes factores de crecimiento, y que regula decenas de blancos celulares, las cuales dependen del tipo celular y determinan la respuesta a la insulina de un tejido particular. Algunas de las proteínas que regula Akt y que promueven las principales acciones metabólicas de la insulina son: el transportador de glucosa GLUT4, la cinasa de la sintasa de glucógeno 3 (GSK3) y los factores de transcripción FOXO y SREBP1. El transportador de glucosa GLUT4 es reclutado a la membrana plasmática en respuesta a la insulina, con lo cual se comienza el transporte de glucosa al interior de la célula.

La GSK3 es una cinasa atípica ya que se encuentra constitutivamente activa, por lo que su regulación implica inhibición de su actividad. En el caso particular del hígado y del músculo al estar activa, fosforila e inhibe a la sintasa de glucógeno, por lo que al ser fosforilada por Akt la sintasa de glucógeno se activa, lo que promueve la síntesis de glucógeno.

Por último los factores de transcripción FOXO-1 y SREBP1C, los cuales ejercen un control positivo sobre la gluconeogénesis hepática y negativo sobre la lipogénesis, respectivamente (Burgering y Kops, 2002; Accili y Arden, 2004; Eberlé et al. 2004). En conjunto, la regulación de estas proteínas por Akt modula de forma importante la homeostasis de la glucosa en respuesta a la insulina. Sin embargo, es importante mencionar que Akt también regula otras proteínas, cuyos efectos son el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular (Collado et al. 2000; Cohen, 2013; O'Neill, 2013).

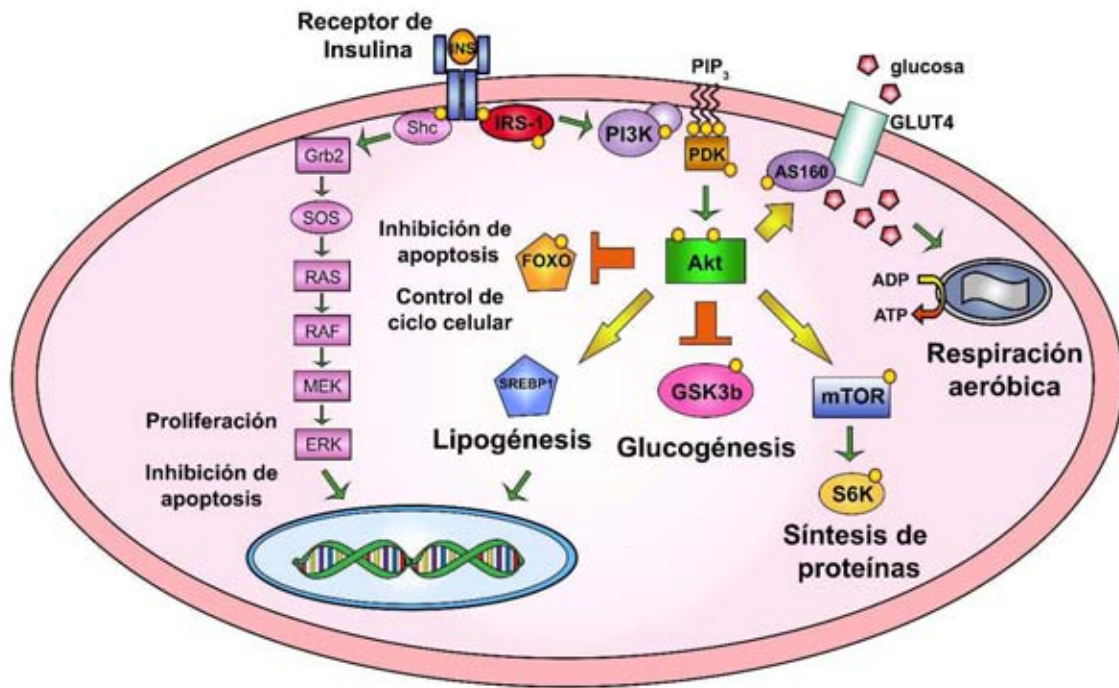


Figura 2. Vía de señalización de la insulina. El receptor de insulina al ser activado por el ligando induce la cascada de señalización de las MAPK (izquierda) mediante el adaptador Shc, lo que trae como consecuencia la transcripción de genes relacionados con la proliferación y la inhibición de la apoptosis. Adicionalmente se activa la vía de señalización IRS-1/PI3-K/Akt en la cual se activan distintos efectores mediante la fosforilación de Akt: el reclutamiento del transportador de glucosa GLUT4 por la GTPasa AS160, lo que promueve captura de glucosa; mTOR/S6K que regula la síntesis de proteínas y autofagia; la GSK3 β que regula la glucogénesis en hígado y músculo pero que también puede fosforilar diversas proteínas; SREB1 y FOXO, que son factores de transcripción que regulan la lipogénesis y la inhibición de la gluconeogénesis hepáticas, la inhibición de la apoptosis y el control del ciclo celular. Los círculos amarillos representan fosforilaciones que regulan a los efectores de la vía de señalización (Erika Calvo-Ochoa, 2015).

El papel de la insulina en el cerebro

El receptor de insulina se expresa de manera diferencial en el sistema nervioso central (SNC), siendo más abundante en el bulbo olfatorio, la corteza, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo y se encuentra enriquecido en astrocitos y neuronas, particularmente en terminales sinápticas (Zhao et al. 1999; Apostolatos et al. 2012).

A pesar de que el papel de la insulina como regulador metabólico se ha estudiado de manera muy extensa, su función dentro del SNC es mucho menos conocida, debido principalmente a que se consideraba al cerebro como un órgano sin respuesta a la insulina. Una de las primeras funciones conocidas de la insulina en el cerebro es la regulación hipotalámica del metabolismo energético, que incluye: el control sobre la ingesta de alimentos, la homeostasis del balance energético y la glucosa periférica, la regulación de la glucogénesis hepática y muscular y la lipogénesis, efectos que dependen de la estimulación de las neuronas productoras de pro-opiomelancortina (POMC) y de péptido relacionado con Agouti (AgRP) en el hipotálamo (Werther et al. 1987; Blouet et al. 2008; Ono et al. 2008). Recientemente se ha demostrado que estas zonas del cerebro pueden presentar resistencia a la insulina, lo cual contribuye al desarrollo de: obesidad, resistencia a la insulina periférica, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (Werther et al. 1987; Blouet et al. 2008; Ono et al. 2008).

Las neuronas no requieren insulina para la captura de glucosa, debido a que expresan transportadores GLUT 3 (independientes de insulina), aunque algunas neuronas de zonas como el hipocampo pueden llegar a co-expresar los transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT 4 y GLUT 8, lo cual les permite aumentar la captura de glucosa en situaciones de alta demanda energética de forma insulino-dependiente (Hasselbach et al. 1999; Sankar et al. 2002; El Messari et al. 2002; Reagan et al. 2002; Alquier et al. 2006). Por lo tanto, la insulina más que una función metabólica en las neuronas, actúa como factor de crecimiento y regula procesos como la supervivencia, el metabolismo, el crecimiento, la

migración, la diferenciación, la síntesis de proteínas, la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal (Watson y Craft, 2004; Apostolatos et al. 2012; O'Neill, 2013).

El origen de la insulina cerebral sigue siendo materia de controversia. Está bien establecido que la insulina periférica cruza la barrera hematoencefálica a través de un transporte activo mediado por receptores de insulina altamente regulados (Hasselbach et al. 1999; Woods et al. 2003). También se sabe que hay una gran concentración de insulina en el hipotálamo, el bulbo olfatorio, la corteza y el hipocampo, zonas del sistema nervioso central ricas también en receptor de insulina. Se ha propuesto que esta insulina es localmente producida, ya que existen evidencias de la síntesis de insulina por neuronas *in vitro* y se ha reportado la presencia de mRNA de insulina y de péptido-C (el cual no cruza la barrera hematoencefálica) en el sistema nervioso central (Dorn et al. 1983; Devaskar et al. 1993; Devaskar et al. 1994; Schechter et al. 1996; Schulingkamp et al. 2000; Schwartz et al. 2013; Ghasemi et al. 2013).

El papel de la insulina en el hipocampo

Se ha descrito en diferentes modelos animales y humanos que la insulina en el hipocampo participa en funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, modulando la síntesis de proteínas, la sinaptogénesis y el establecimiento de plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo (LTP) (Gerozisis, K. 2003; Nelson et al. 2005; Huang et al. 2010). Se ha observado un aumento del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) en membranas sinápticas hipocampales en animales durante el proceso de aprendizaje (Zhao et al. 2004; Hori et al. 2005; Nelson et al. 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que la administración de insulina, en condiciones euglicémicas, mejora el resultado de pruebas de memoria, atención y de aprendizaje (Gerozisis et al. 2003; Reger et al. 2006; Huang et al. 2010).

Se desconocen todos los efectos celulares de la insulina sobre la cognición, pero se han descrito algunos mediados por la cinasa Akt, la cual regula procesos de supervivencia y

metabolismo celular, así como la síntesis de proteínas requeridas para el establecimiento de la LTP y la sinaptogénesis (Liao et al. 2008; Garelick et al. 2011). De forma importante, se ha demostrado que la diabetes y la resistencia a la insulina sistémica reducen el aprendizaje espacial y el establecimiento de la LTP hipocampal, y que la administración de insulina revierte estos efectos (Geroszisz et al. 2003; Reger et al. 2003), lo que apoya más el papel de la insulina como un mediador de la cognición en el hipocampo.

Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina celular asociados a la obesidad

Como se mencionó anteriormente, la resistencia a la insulina se define como la disminución de la señalización de insulina en las células. Una gran cantidad de estudios han descrito múltiples mecanismos que contribuyen al desarrollo de esta resistencia en diferentes tipos celulares debido a la obesidad generada por la ingesta de dietas hipercalóricas. Es importante mencionar que estos mecanismos pueden ocurrir de forma individual, pero lo más probable es que *in vivo* algunos de ellos se presenten de forma simultánea.

La resistencia a la insulina asociada con obesidad se presenta debido a la combinatoria de los siguientes factores: aumento en la cantidad de ácidos grasos libres en plasma, dentro de los cuales el ácido palmítico ha sido descrito como uno de los más importantes; inflamación del tejido adiposo; estrés del retículo endoplásmico; acumulación intracelular de ceramidas y estrés oxidante (Shulman, G. 2000; Qatani y Lazar, 2007; Hoen et al. 2008). Todos estos diferentes fenómenos, que pueden ocurrir simultáneamente en un estado de obesidad, convergen en un mecanismo molecular común: la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina. Estas fosforilaciones regulan de manera negativa a IRS-1, impidiendo que reconozca al receptor de insulina activado y deteniendo la transducción de señales de la insulina de forma intracelular (Figura 3) (Zick, 2004; Gual et al. 2005; Luo et al. 2005; Herschkovitz et al. 2007; Weigert et al. 2008; Tanti y Jager, 2009). Ratones transgénicos que tienen las serinas de IRS-1 mutadas por alaninas en músculo no desarrollan resistencia a la insulina inducida por dietas altas en grasas, lo cual demuestra el papel fundamental de la fosforilación de estos residuos en la regulación negativa de IRS-1 (Morino et al. 2008).

Absorción de grasas presentes en la dieta y captura de ácidos grasos por las células

Las grasas presentes en la dieta se encuentran en su gran mayoría en forma esterificada, es decir como triglicéridos, los cuales son emulsificados por las sales biliares en el intestino delgado y finalmente, en el intestino grueso son acoplados a apolipoproteínas y colesterol para formar quilomicrones, lo que permite su absorción y su transporte por el plasma (Hussain MM, 2000; Hussain MM, 2014; Giamanco et al. 2015).

Dentro de los quilomicrones circulantes en el plasma se activa la lipoproteína lipasa, la cual hidroliza los triglicéridos hacia ácidos grasos libres, o no esterificados. Estos ácidos grasos libres pueden ser internalizados a la célula de todos los tejidos mediante difusión pasiva por la membrana celular o por diversas proteínas tejido-específicas que también se regulan en respuesta a hormonas y condiciones energéticas particulares. Dentro de estos transportadores se encuentran las proteínas de unión a ácidos grasos, o FABPs (fatty acid-binding proteins) membranales; las proteínas transportadoras de ácidos grasos, o FATPs (fatty acid-transporter proteins) y la traslocasa de ácidos grasos CD36 (Abumrad et al. 1993; van der Vusse et al., 2002; Mashek y Coleman, 2006; Doege et al. 2006; Glatz et al. 2010).

Dietas altas en grasa y aumento de la concentración de ácidos grasos libres en suero

Los tejidos que capturan una mayor cantidad de ácidos grasos de los quilomicrones son el tejido adiposo, el músculo y el hígado. En estos tejidos se produce la re-esterificación de los ácidos grasos libres por el proceso de lipogénesis, el cual es regulado por la insulina. En el tejido adiposo se lleva a cabo la mayor captura de ácidos grasos libres así como la mayor producción de triglicéridos que se almacenan como gotas de grasa dentro de los adipocitos. Por otro lado, en el hígado los triglicéridos forman parte de las lipoproteínas VLDL que también contienen grandes cantidades de colesterol y en segunda instancia se almacenan en caso de un exceso. En el músculo, de forma general los ácidos grasos capturados se utilizan

como forma de energía y sólo se almacenan en forma de triglicéridos si existe un exceso (Bickerton et al. 2007; Goldberg et al. 2009; Ali et al. 2015).

En el caso de una ingesta excesiva y prolongada de triglicéridos, como es el caso de una dieta alta en grasas, la concentración de ácidos grasos libres en plasma aumenta de forma considerable. Para empezar, existe una mayor concentración de triglicéridos acoplados a quilomicrones postprandiales, lo cual aumenta la captura de ácidos grasos sistémica y la lipogénesis en tejido adiposo y en el hígado. El aumento en la concentración intracelular de ciertos ácidos grasos de cadena larga ha sido descrito como un mecanismo que ocasiona resistencia a la insulina transitoria por lipotoxicidad (*vide infra*) (Anderwald y Roden, 2004; Granholm et al. 2008; Schwingshackl y Hoffmann, 2013).

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo tiene dos consecuencias importantes para el aumento de ácidos grasos libres: por una parte, se disminuye la lipogénesis ya que al reducirse la captura de glucosa mediada por GLUT4 se disminuyen los metabolitos de la glucólisis gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de hidroxiacetona, precursores del glicerol-3-fosfato necesario para la esterificación de los ácidos grasos. Por otro lado, se disminuye el control negativo que ejerce la insulina sobre la lipólisis (Ali et al. 2015; Gustafson et al. 2015).

Lipotoxicidad y resistencia a la insulina: papel del ácido palmítico

En varios estudios se ha reportado que el incremento de la concentración intracelular y/o la oxidación de algunos ácidos grasos produce lipotoxicidad y resistencia a la insulina. Los mecanismos descritos para estos fenómenos son múltiples, dependiendo del tipo de ácido graso así como del tipo celular (Rial et al. 2010; Cheng et al. 2010; López et al. 2010; Carobbio et al. 2011; Savary et al. 2012).

Dentro de la célula, los ácidos grasos son metabolizados en la mitocondria y se generan tanto ATP como múltiples metabolitos, dentro de los que se encuentran el diacilglicerol y

las ceramidas. Estos metabolitos activan a la cinasa PKC (protein kinase C), particularmente a la isoforma θ , la cual es capaz de fosforilar a IRS-1 en residuos de serina impidiendo su unión con el receptor de insulina fosforilado. Esta misma cinasa se activa por el diacilglicerol generado como segundo mensajero en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G cuyo ligando son algunos ácidos grasos (Figura 3) (Roden et al. 1996; Dresner et al. 1999; Griffin et al. 1999; Milligan et al. 2006; Watt y Steinberg, 2007; Glass y Olefsky, 2012).

Está descrito que no todos los ácidos grasos producen resistencia a la insulina. Los ácidos grasos saturados de cadena larga han sido reportados como los más deletéreos tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se les ha asignado un rol importante en la patogénesis de enfermedades metabólicas y cardiovasculares como la obesidad, la resistencia a la insulina sistémica, diabetes mellitus tipo 2 y la aterosclerosis (Lovejoy et al. 2002; Kien et al. 2005).

El ácido palmítico (C16:0) es el ácido graso saturado de cadena larga más abundante en la dieta humana, ya que es la grasa prevalente en carnes, productos lácteos y en los aceites de coco y palma. Asimismo, en la literatura se encuentran múltiples reportes de que la exposición al ácido palmítico *in vitro* o *in vivo*, debido a la ingesta de dietas enriquecidas en este ácido graso, promueven resistencia a la insulina en diversos tipos celulares incluyendo neuronas (Patil et al. 2005; Williams PG, 2007; Patil et al. 2007; Burratta et al. 2008; van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008; White B, 2009; Lee et al. 2010; Benoit et al. 2010; Mayer et al. 2010; Kim et al. 2011).

Se sabe que el ácido palmítico administrado de forma sistémica es transportado al cerebro de forma rápida para su posterior metabolismo e incorporación a membranas celulares (Kimes et al. 1983; Gnaedinger et al. 1988; Hamilton y Brunaldi 2007; Mitchell et al. 2011). Adicionalmente, en la obesidad y el síndrome metabólico se incrementa el transporte de ácidos grasos al cerebro, y el ácido palmítico aumenta en más de 80% en varias regiones del cerebro, incluida el hipocampo (Karmi et al. 2010).

Dietas altas en grasas y la vía de mTOR/S6K

La cinasa de serina/treonina activada tanto por nutrientes como por factores de crecimiento, mTOR (mammalian target of rapamycin), es un sensor del estado metabólico de la célula. mTOR media sus acciones a través de la activación de sus dos efectores principales: la cinasa S6K y el inhibidor de la iniciación de la traducción, eIF-4EBP, lo que promueve la síntesis de proteínas, inhibición de la autofagia y crecimiento y diferenciación celular (Kraegen et al., 1991; Liao et al., 2008; Blouet et al., 2008; Ono et al., 2008). La vía de mTOR/S6K es activada por la insulina y funciona como un loop de regulación negativa de dicha vía de señalización. S6K fosforila a IRS-1 en residuos de serina, lo que atenúa la señalización de insulina (Aguirre et al., 2000; Blouet et al., 2008; Ono et al., 2008).

La vía de mTOR/S6K se activa preferencialmente por nutrientes. Una de las vías de señalización involucradas en esta activación es la de la cinasa AMPK (AMP-activated kinase), la cual sensa los niveles de ADP/ATP de la célula y se activa en respuesta a altas concentraciones de ADP. Cuando se encuentra activa, es decir en condiciones de bajas reservas energéticas, ejerce una regulación negativa sobre mTOR; de forma contraria, al encontrarse inactiva por altas concentraciones de ATP, mTOR se activa (Gleason et al. 2007; Gwinn et al. 2008; Coughlan et al. 2013). Por lo tanto, las dietas altas en grasa y azúcares generan una activación continua de la vía AMPK/mTOR/S6K, lo que promueve la fosforilación en serina de IRS-1 por S6K y por lo tanto, una reducción de la respuesta a insulina (Figura 3). Se ha descrito a este mecanismo como uno de los principales promotores de resistencia a la insulina por dietas hipercalóricas en tejidos metabólicos como el hígado y el músculo (Wang et al., 2001; Harrington et al., 2005; Um et al., 2006), así como en el hipotálamo (Blouet et al., 2008; Ono et al., 2008). Lo anterior sugiere que la vía de mTOR/S6K podría estar asociada a la resistencia a la insulina por dietas altas en grasa no solamente en órganos periféricos, sino también en el sistema nervioso central, en zonas de respuesta a la insulina como el hipotálamo y el hipocampo.

Inflamación

Una de las características fisiopatológicas de la obesidad es la presencia de inflamación que comienza con la liberación de citocinas inflamatorias, adipocinas y quimiocinas por el tejido adiposo, lo que promueve el reclutamiento de macrófagos y monocitos de forma local. Si este estado pro-inflamatorio persiste se promueve un estado de inflamación sistémica que se ha denominado por varios grupos como “inflamación de bajo grado” (Canello y Clement, 2006; Lasselin y Capuron, 2014). Dentro de las citocinas que juegan un rol importante en el establecimiento de la resistencia a la insulina se han identificado a TNF- α , a IL-6, IL-10 y a IL-1. Todas ellas activan a la cinasa JNK (c-Jun NH2-terminal kinase), la cual también fosforila a IRS-1 en residuos de serina (Figura 3) (De Taeye et al. 2007; Solinas y Karin, 2010; Charles et al. 2011; Glass y Olefsky, 2012; Matsubara et al. 2012). Se ha reportado por varios grupos que diferentes fármacos y componentes antiinflamatorios mejoran la sensibilidad a la insulina en modelos de obesidad por dietas altas en grasa, lo que demuestra el papel de los componentes inflamatorios en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Yuan et al. 2001; Roy et al. 2014; Zhao et al. 2014)

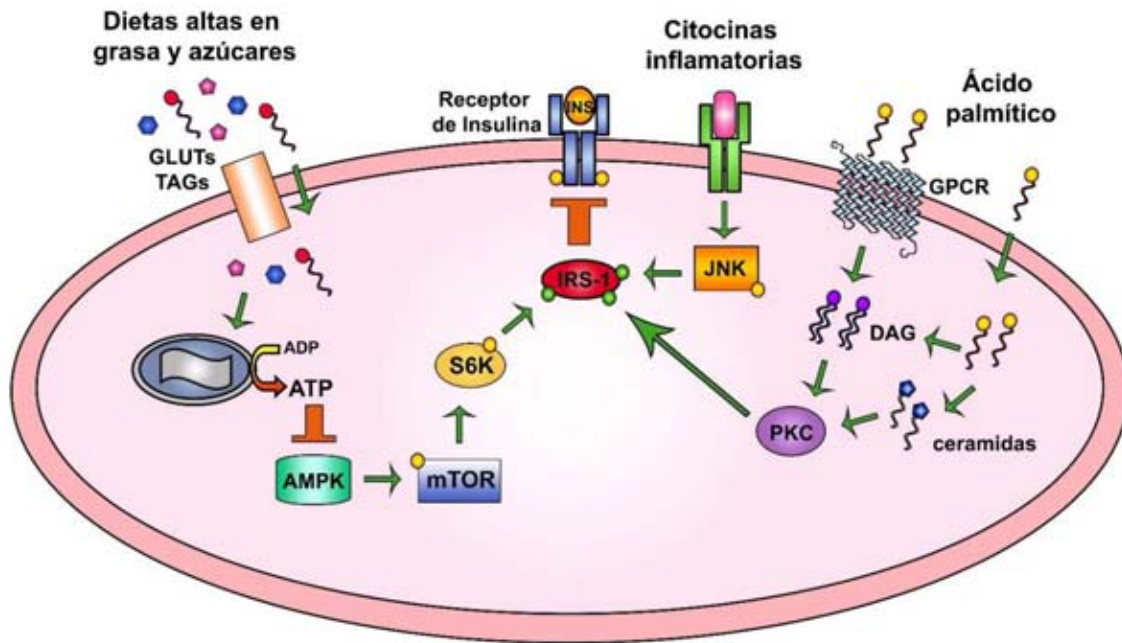


Figura 3. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina celular asociados a la obesidad. Varios mecanismos convergen en la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina por las cinasas S6K JNK y PKC θ . Estas fosforilaciones en serinas impiden el reconocimiento del receptor de insulina fosforilado y su posterior fosforilación en residuos de tirosina. Las dietas altas en grasas y azúcares activan la vía de mTOR/S6K mediante la inhibición de la cinasa sensora de nutrientes AMPK, la cual es inhibida por altas concentraciones de ATP generadas en la mitocondria. Las citocinas inflamatorias activan a la cinasa JNK y finalmente, algunos ácidos grasos saturados de cadena larga, en particular el ácido palmítico, activan a PKC θ por diferentes mecanismos que incluyen: la activación de GPCRs que producen diacilglicerol (DAG) como segundo mensajero; la formación de DAG como metabolito directo de los ácidos grasos, y la formación de ceramidas (Erika Calvo-Ochoa, 2015).

Antecedentes

“Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signaling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer’s disease. Animal models of study”

Calvo-Ochoa Erika, Arias Clorinda. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2015. January. doi: 10.1002/dmrr.253.

Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models

Erika Calvo-Ochoa
Clorinda Arias*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Mexico

*Correspondence to: Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70–228, 04510 Mexico, DF, Mexico.
E-mail: carias@servidor.unam.mx

Summary

A growing body of animal and epidemiological studies suggest that metabolic diseases such as obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus are associated with the development of cognitive impairment, dementia and Alzheimer's disease, particularly in aging. Several lines of evidence suggest that insulin signalling dysfunction produces these metabolic alterations and underlie the development of these neurodegenerative diseases. In this article, we address normal insulin function in the synapse; we review and discuss the physiopathological hallmarks of synaptic insulin signalling dysfunction associated with metabolic alterations. Additionally, we describe and review the major animal models of obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. The comprehensive knowledge of the molecular mechanisms behind the association of metabolic alterations and cognitive impairment could facilitate the early detection of neurodegenerative diseases in patients with metabolic alterations, with treatment that focus on neuroprotection. It could also help in the development of metabolic-based therapies and drugs for using in dementia and Alzheimer's disease patients to alleviate their symptoms in a more efficient and comprehensive way. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords insulin resistance; diabetes; hippocampal dysfunction; Alzheimer's disease; cognitive decline; obesity

Introduction

High dietary intake and sedentary lifestyle has increased alarmingly in the past years in western societies. The chronic consumption of diets rich in saturated fats and high fructose joined to physical inactivity are thought to promote a variety of metabolic disorders including the following: obesity, insulin resistance (InsRes), metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [1]. These metabolic diseases have reached epidemic proportions; it is estimated that 500 million adults and 40 million children are obese, and 347 million people

Received: 14 August 2013

Revised: 3 December 2013

Accepted: 15 January 2014

have diabetes worldwide [2,3]. It is known that these diseases increase the risk of morbidities that greatly reduce the quality and the life expectancy. In general, overfeeding and obesity may be associated with reduced insulin sensitivity, which is defined as a diminished ability of cells to respond to the action of insulin. When InsRes is present in the major tissues that respond to this hormone, liver, muscle and adipose tissue, it becomes a syndrome. Systemic InsRes is characterized by hyperglycaemia, dyslipidemia and compensatory hyperinsulinemia [1,4]. In general, InsRes and obesity are two diseases commonly referred as a part of the metabolic syndrome, which is often comorbid with elevated blood pressure, cardiovascular disease, dyslipidemia, hypercholesterolemia and prothrombotic and proinflammatory states [5,6]. InsRes associated with obesity, metabolic syndrome and T2DM, all of which represent a risk for the development of a variety of cognitive deficiencies including Alzheimer's disease (AD) [7–11]. Epidemiological studies have also found that InsRes and T2DM modulate AD clinical manifestations [11–14]. In fact, T2DM has been identified as a risk factor for AD, supported by increasing epidemiological evidence showing that patients suffering T2DM almost doubles the risk of developing this devastating neurodegenerative condition. The risk for developing AD increases when is associated with cardiovascular disorders or dyslipidemia [15]. The aforementioned connection between metabolic disorders that have in common InsRes and cognitive impairment affect millions of people worldwide and severely impact quality of life. Therefore, studying the action of insulin in the brain and the relationship between metabolic diseases and altered neuronal functioning is essential to unravel the molecular mechanisms behind it. It will also help to develop new drugs for treating both metabolic and neurodegenerative diseases in a more comprehensive way and to reduce the burden on the quality of life that these diseases pose individually and particularly, combined.

Insulin as synaptic modulator

The notion that the brain is a direct target of insulin action and that it regulates a variety of metabolic and non-metabolic functions is being discovered. In general, the molecular mechanism of insulin signalling has been described to be the same in all organs, including the brain. Insulin activates the insulin receptor (IR) followed by the activation of the IR substrate (IRS) proteins on two canonical pathways, the phosphoinositide-3 kinase (PI3-K)/Akt and the Ras/mitogen-activated kinase cascades [16–19]. IR are widely expressed in the soma and enriched in synaptic terminals of neurons of different brain regions such as hippocampus, cortex, hypothalamus, amygdala,

entorhinal cortex and olfactory bulb [18–21]. The origin of cerebral insulin is still an ongoing subject of study, but it is actually known that peripheral insulin produced in the pancreas enters the brain via a blood–brain barrier (BBB) saturable transporter, and it is believed that this peripheral insulin is the main source of insulin present in the cerebrospinal fluid [22–26]. On the other hand, in mammals, it has been described that mature insulin is produced and secreted by adult neurons present on the olfactory epithelium and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, although in much smaller concentrations than in the pancreas [27–31]. Because IR are expressed in very particular brain regions, it has been proposed that this locally produced insulin functions mostly in an autocrine manner within the olfactory bulb and the hippocampus, although some paracrine function by means of diffusion of insulin into the cerebrospinal fluid cannot be discarded. It has also been described that IR and insulin levels can be up-regulated in the olfactory epithelium by reducing peripheral insulin levels with a 24 or 48 h fasting, which suggest that there is a compensatory effect for the lack of peripheral insulin in some brain regions [30]. Insulin plays a pivotal role in neuronal function, by regulating energy metabolism, growth, survival and differentiation [30–35]. Optimal levels of insulin in the brain are neuroprotective and neurotrophic, and also enhance memory and facilitate synaptic plasticity in the hippocampus, a brain region that plays important roles in memory and learning [33,36–38]. PI3-K/Akt and S6K/mTOR pathways are mostly believed to be the ones involved in neuronal survival, whereas Ras/mitogen-activated kinase pathway is mostly involved in cell death [35]. Activity-dependent modification of synaptic strength underlies cognitive functions such as learning and memory in plastic regions of the brain, such as the cortex and hippocampus. Emerging data indicate that insulin may participate in synaptic plasticity through the activation of canonical PI3-K signalling [33]. Furthermore, the IR and its mRNA are largely localized in synaptic terminals where they regulate neurotransmitter release and receptor recruitment [19] supporting its role in the control of synaptic events. In this regard, it has been firmly recognized that insulin promotes the establishment of hippocampal long-term potentiation (LTP), a process thought to underlie learning and memory (Figure 1) [33,37]. Some of the mechanisms by which insulin exerts its effects on cognition and learning are thought through modulating the expression of NMDA and AMPA receptors, increasing Na^+ and Ca^{2+} influx and reinforcing synaptic transmission [38,39]. Insulin can also regulate the concentration of several neurotransmitters such as acetylcholine and increases the release of norepinephrine and epinephrine and inhibits their reuptake [40,41]. Additionally, insulin promotes the accumulation of GABA_A receptors to the postsynaptic membranes and participates in the

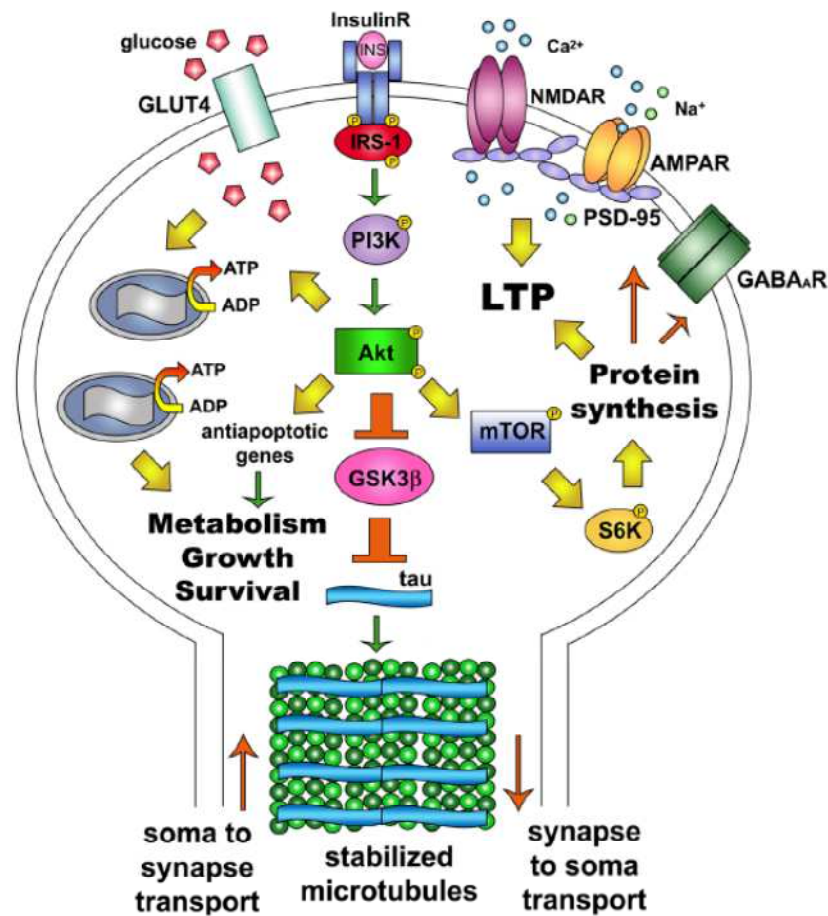


Figure 1. Insulin signalling in hippocampal synapses. Insulin (INS) activates its receptor, which leads to the activation of the IRS-1/PI3-K/Akt cascade. mTOR/S6K signalling becomes activated and promotes protein synthesis within the synapse, particularly of PSD-95 and NMDAR, AMPAR and GABA_AR receptors. Akt promotes the localization of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 and of the glutamate receptors NMDAR, AMPAR and GABA_AR to the membrane, therefore promoting the uptake of glucose and the entrance of Na⁺ and Ca²⁺ to the synapse. Insulin signalling also inhibits GSK3β activity, avoiding tau phosphorylation. Overall, enhanced synaptic metabolism, glutamate transmission, protein synthesis and transport from and to the nucleus promoted by insulin lead to the synapse and neuron survival, growth, and to the establishment of LTP and finally, memory and learning

translation of the postsynaptic protein PSD-95 [42,43]. Altogether, this data indicates that IR signalling regulates structural and functional aspects of synapses.

It has been traditionally considered that the brain is an insulin-insensitive organ regarding glucose uptake and energy metabolism, in view that the brain mainly expresses the two insulin-insensitive glucose transporters GLUT1 and GLUT3. However, recent studies have found GLUT4 expression and insulin-dependent translocation in hippocampus [44,45]. In fact, it was recently reported that insulin at physiological doses transiently enhances the mitochondrial redox activity in the presynapsis of cortex and hippocampus [46]. These findings suggest an additional role of insulin as an energy expenditure regulator within the hippocampus that might be crucial to maintain the high metabolic demands associated with the establishment of synaptic plasticity, learning and memory.

Metabolic alterations and cognitive performance

Although obesity, metabolic syndrome, InsRes and T2DM are different diseases, they often occur combined because they share most of their pathological markers and physiopathological cascades. These metabolic alterations could be understood as a continuum where the state of InsRes and insulin production determines the pathological outcome of the disease. InsRes is the central feature of lipid and hemodynamic abnormalities occurring in metabolic syndrome and is frequently a precursor of glucose uptake dysregulation and T2DM. In obesity, the amount of insulin production remains unchanged, and therefore, insulin signalling is normal. But as this condition progresses, InsRes increases up to the point where more insulin

is produced in order to maintain insulin signalling. If the disease worsens, pancreatic β -cells are not able to produce more insulin, and therefore, the blood glucose concentration starts to increase. Because high glucose is cytotoxic to β -cells, the amount of insulin produced drops. In this case, T2DM develops. Obesity and metabolic syndrome generally are present through the development of InsRes and its transition to T2DM [1,47,48].

Due to the role of insulin in the hippocampus, changes in systemic insulin levels and sensitivity as a result of metabolic disturbances may have a negative impact into neuronal function. In fact, insulin effects on memory performance have been documented in both humans and animals. In rats, one dose of intracerebroventricular (icv) insulin improves passive avoidance memory task [49] and chronic intranasal administration by 1 week induced an increase in object recognition memory in awake mice [50]. In humans, the same procedure induces better performance of hippocampal-dependent declarative memory in healthy adults, obese men and young and postmenopausal women [51–56]. Interestingly, the improvement of verbal memory in Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) patients induced by insulin was dependent on the apolipoprotein E genotype [57].

Because insulin promotes cognitive performance in the hippocampus, alterations in different elements of its signalling pathway have been implicated in cognitive decline. For example, icv infusions of the PI3-K inhibitor LY294002 blocked LTP maintenance in the hippocampus *in vivo* [58]. Additionally, *in vivo* infusion of the PI3-K inhibitor wortmannin together with LY294002 and the mTOR inhibitor, rapamycin into the prefrontal cortex also inhibited the long-term retention of trace fear memory [59].

A growing body of epidemiological studies, clinical analysis and animal models has associated insulin dysfunction with diminished cognitive skills ranging from learning and memory disturbances to MCI and even with AD [60–64]. These observations have led some groups to propose that AD is fundamentally a metabolic disease with substantial and progressive derangements in brain glucose utilization and responsiveness to insulin [65–67]. Therefore, when insulin signalling is disturbed, a specific form of InsRes may develop as a brain-specific form of diabetes. In fact, there is a current hypothesis of the 'metabolic-cognitive syndrome' and AD as a 'type 3 diabetes mellitus' [62,67,68]. However, it is important to distinguish between the impact of insulin signalling disturbances in the origin of cognitive alterations and the brain insulin-mediated neuromodulatory effects. It is also important to establish the relationship between peripheral insulin levels and insulin contents and activity in the brain. In this regard, a recent case-control designed epidemiological analysis has found that higher insulin circulating levels associates with slower cognitive decline and with less brain atrophy at early steps of AD over 2 years; but in

normal controls, higher insulin was associated with worse performance and more rapid decline [68]. From these results, it is possible to suggest that InsRes might have a role in the development of AD, but once the neuropathology is established, some changes occurring in AD brain also affect peripheral insulin-mediated physiology.

In older adults without dementia, InsRes has detrimental long-term cognitive effects [69], and it was found that high serum insulin levels associated with worse cognitive performance in multiple domains, but it was not a consistent predictor for AD cases [70]. Thus, these studies point the necessity to expand current investigation to better understand the timing of insulin effects with a specific brain function and the interplay between systemic and brain insulin signalling.

Based on experimental and clinical studies that support a role for insulin in a variety of neuronal functions ranging from energy production to plasticity events, particularly in the hippocampus, insulin is currently being analysed as a therapeutic tool to preserve cognitive function during aging and in neurodegenerative diseases.

Epidemiological studies

Cumulative evidence derived from epidemiological studies has found an increased risk for diverse cognitive disabilities in patients that carried different degrees of metabolic alterations, ranging from obesity to T2DM. Obesity in midlife was found to be associated with an increased risk of dementia and AD in aging [71–74]. Also, it was reported that in aged overweight women, an increase in one point in body mass index, from age 70, increased the AD risk by 36% [75]. Patients suffering of metabolic syndrome have increased risk for presenting cognitive decline, dementia and AD [76–83]. In the same way, metabolic syndrome, InsRes and diabetic aged patients had a decreased performance on cognitive test and greater risk of developing MCI and AD. This association was also found in insulin-treated diabetic subjects [84–94]. It was also reported that T2DM in midlife increases the risk for presenting AD later in life and that T2DM accelerates the progression from MCI to dementia [94,95]. It is of interest that centenarian individuals that show increased sensitivity to insulin also have decreased activity of its downstream effector, the mammalian target of rapamycin (mTOR) [96]. Thus, longevity seems to be associated with the reduced activity of the insulin-mediated PI3-K/Akt/mTOR pathways, implicating these signalling cascades as important targets for pharmacological manipulation [96].

Even though epidemiological studies provide essential information on the occurrence and association of

metabolic alterations and cognitive impairment in humans, they do not provide information about the molecular mechanisms of this relationship and the therapeutic windows that allow the treatment of this metabolic diseases before irreversible damage occurs in both, systemic functionality and cognitive skills. Therefore, animal models have been used to study the complex molecular and cellular mechanisms underlying the metabolic component of cognitive impairments associated to MCI and AD.

Animal models of metabolic diseases

Because obesity, InsRes, metabolic syndrome and T2DM share some physiopathological traits, a number of animal models have been designed for the study of more than one of these diseases. They have been used for studying, among other things, the association of insulin signalling and cognitive disabilities.

The relevance of the insulin/PI3-K pathway to the development of AD biomarkers has been studied in a mouse model of hyperinsulinemia in which systemic insulin administration promoted tau phosphorylation as shortly as 10 min after insulin administration [97]. In this sense, it has been also demonstrated that insulin prevents the phosphorylation of presenilin 1 via PI3-K/Akt, and in this way, positively regulates A β production [98].

High fat and sugar diets

One of the most widely used model for studying metabolic alterations in non-transgenic animals is the use of high fat and sugar diets (HFD) [1]. Both wild-type and obesity-prone rodents develop obesity, dyslipidemia, InsRes and some markers of metabolic syndrome after chronic consumption of high-caloric diets, particularly those supplemented with saturated fat and fructose [1,48,49]. HFD fed rodents show a deficient execution in memory and learning tasks associated with structural and physiological neuronal changes such as reduced number and complexity of dendritic spines in CA1, altered establishment of LTP and long-term depression, and diminished DG neurogenesis [33,99–107]. The reduction of LTP and synaptic plasticity in HFD models has been correlated with a decreased expression of brain-derived neurotrophic factor, cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, and the synaptic proteins synapsin and stargazin [99,102]. The intake of high fat and high cholesterol diets for 8 weeks was also associated with loss of dendritic integrity and signs of neuroinflammation with gliosis and a reduced BBB integrity [103,108]. These findings suggest a biological mechanism for the poor cognitive performance after chronic HFD feeding. Interestingly, the positive effect on intrahippocampal insulin administration on

memory function is significantly reduced in rodents fed with HFD demonstrating that the insulin-resistant state contributes to an abnormal hippocampal memory processing [109].

Because rodents do not develop AD, several transgenic mice have been developed to mimic the physiopathological markers that accumulate in the AD brain, which are the deposition of amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs), formed by the amyloid- β protein (A β) deposits and the hyperphosphorylated tau, respectively [15,110,111]. In several AD transgenic mice, HFD aggravates the memory deficits and the amyloidogenic amyloid precursor protein (APP) processing through γ -secretase activity. Other pathological markers including A β deposition and inhibition of the A β clearing enzyme insulin degrading enzyme (IDE) were also present. Additionally, an increase in insoluble pool of tau, signs of neuroinflammation and increased markers of oxidative stress are consistently observed in the brain of this transgenic mouse models exposed to HFD [110,112–115]. Interestingly in a non-transgenic model of AD, HFD drives an increase of APP protein levels, correlating with proinflammatory changes consisting of reactive gliosis and elevated microglial TNF α production [111].

Streptozotocin-induced diabetes and its relationship with AD-type dementia

This model of drug-induced diabetes has been widely used in rodents for testing the effects of the lack of insulin in the organism. Streptozotocin (STZ) is particularly toxic to pancreatic β -cells; therefore, the lack of insulin mainly mimics type 1 diabetes mellitus. STZ is taken into the β cells because of the glucose portion of the molecule by the low affinity glucose transport 2, and once inside the cell, it induces prooxidant molecules such as nitric oxide. The nitric oxide reacts with a form of oxygen, either superoxide or oxygen, causing oxidative and nitrosative stress that damages the DNA of the β cells [116]. It has been reported that STZ-diabetic rats have an impaired performance in learning and memory tasks, associated with dendritic and synaptic reduction, LTP impairment and diminished hippocampal neurogenesis [117–120]. Another feature of this model includes the presence of hippocampal tau phosphorylation [121–123]. When AD transgenic mice are treated with STZ, hyperphosphorylated tau became more insoluble and progressed to form NFTs, a hallmark of AD pathology [124]. Moreover, an association between insulin deficiency and accelerated A β accumulation has been also found by a mechanism dependent of transcriptional activation of the APP cleaving enzyme 1 [125]. Additional evidence of the relationship between insulin dysfunction, cognitive alterations and dementia have arisen from the icv injection of STZ

(icv-STZ) used as a model of AD-type dementia [126]. Icv-STZ depletes insulin signalling in brain, leading to LTP impairment and decreased cognitive performance in the hole board task and the passive avoidance paradigm [126–128]. At a molecular level, icv-STZ causes a diminished expression and activity of insulin signalling proteins, GLUT1 and GLUT3, a permanent-impaired brain energy metabolism, mitochondrial function and increased oxidative stress and neuroinflammation [126–130]. Impaired cognition on icv-STZ models has been associated with a reduced expression, trafficking and function of NMDA and AMPA receptors [130–132]. Also, it was found an increase in tau phosphorylation, formation of NTFs and decreased microtubule-binding of tau [130,131]. Reduced functions of the glutamate receptors and tau phosphorylation have been linked to an up-regulation of the enzyme GSK3 β [128,129]. It was also found that cholinergic dysfunction is present in this model [129,133,134]. All these features closely resemble AD alterations. Results obtained with the icv-STZ model are in accordance to evidence showing that abnormalities in brain glucose metabolism and insulin signalling in the hippocampus precede cognitive alterations and AD pathogenesis [135–139]. It is also known that AD further increases this insulin-deficient state [47,138].

Genetic and transgenic models of obesity, InsRes, metabolic syndrome and T2DM

Zucker obese rats, db/db and ob/ob mice are leptin receptor and leptin-deficient rodents, respectively. They are used as a model for obesity, dyslipidemia, InsRes and T2DM because they present hyperphagia and develop obesity, hyperglycaemia and hyperinsulinemia [140–144]. Leptin, first discovered as the product of ‘the obesity gene’ is an adipokine involved in the control of food intake, regulation of energy expenditure metabolism and adipose-tissue mass, through its hypothalamic receptors [145]. Leptin gives signals of satiety and improves insulin signalling, therefore stopping food intake [146]. In these obese and InsRes rodents, a diminished hippocampal-dependent memory associated with impaired LTP and long-term depression in hippocampal CA1 region was reported [147–150]. Also remarkable is a reduction synaptic transmission correlating with decreased Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II function in CA1 and DG [147,149]. It was reported a reduced insulin signalling and impaired glucose metabolism in the brain of these rodents, due to a reduced central nervous system (CNS) import of insulin through the BBB and a decreased GLUT4 expression in the cell surface [150,151]. It has been found that AD transgenic mice crossed with leptin-deficient mice present an earlier and more severe onset of tau phosphorylation, as well as A β deposition, neuroinflammation and

cognitive alterations [151]. These data provide direct evidence of the relationship between the altered neuronal metabolism regulated by a proper balance between insulin/leptin and hippocampal functional damage.

Neuron-specific insulin receptor knockout mice

To study the specific effects of insulin signalling in the brain, a transgenic mice with a knock-out of the IR in neurons was generated. These neuron-specific insulin receptor knockout (NIRKO) mice present increased food intake, diet-induced obesity and InsRes [152]. Additionally, it has been reported an increased activation of GSK3 β accompanied by a more than threefold increase of tau hyperphosphorylation [153], pointing out the role of insulin signalling in the development of this characteristic lesion of AD. However, NIRKO mice do not present alterations in neuronal proliferation or survival, brain development, glucose metabolism or memory performance [152,153]. These data might indicate a role of InsRes as a predisposing factor for development of AD but not a sufficient condition for expressing all the neurodegenerative features characteristic of this disease. This leads to the suggestion that there are other signalling pathways that can compensate the loss of insulin signalling on the brain in NIRKO mice, that is, insulin-like growth factor 1 and that there are alterations present in T2DM or InsRes that affect insulin signalling as well as insulin-like growth factor 1 and other compensatory signalling pathways present not just in the brain, but also centrally.

Molecular changes in the hippocampus caused by metabolic alterations and their relationship with the expression of AD’s markers

Because some of the effects of insulin in the hippocampus are related with the establishment of synaptic plasticity, neuronal growth, antioxidant protection and in some degree, control of glucose metabolism (Figure 1), it is not surprising that the impairment of insulin signalling in hippocampus has a profound effect on LTP establishment and cognitive performance. At a molecular level, the disruption of synaptic IR/PI3-K/Akt/mTOR signalling alters the rate of protein synthesis, mitochondrial function, neurotransmission and protein clearance, among other synaptic processes (Figure 2). It is known that insulin and A β peptide have affinity and compete for the IR binding and for IDE, the enzyme responsible for the degradation and clearance of extracellular insulin and A β [154,155]. In the AD synapse of a patient with

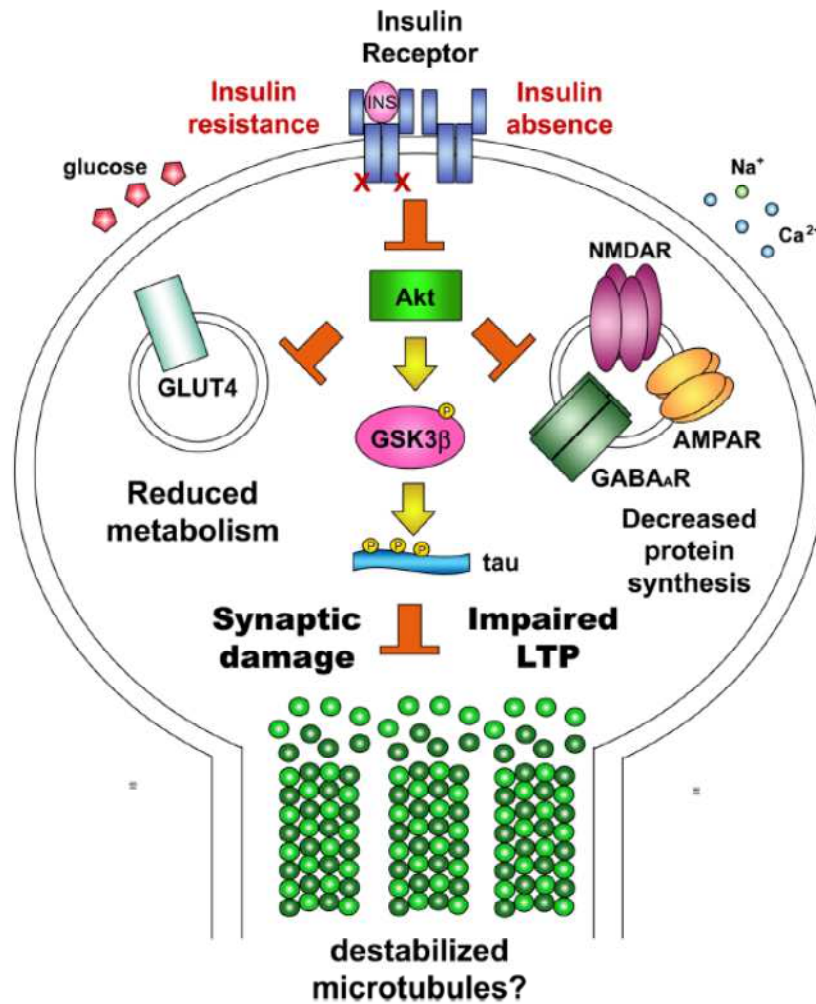


Figure 2. Synaptic insulin signalling dysfunction. A decreased insulin signalling in synapses due to (a) insulin resistance, (b) insulin absence, or both, promotes a decrease in membrane localization of GLUT4, AMPAR and NMDAR to the membrane, which leads to impaired metabolism and glutamate neurotransmission. Insulin impairment promotes GSK3 β activity and tau phosphorylation. Phosphorylated tau does not bind to microtubules, most probably leading to microtubule instability and impaired nuclear transport. Reduced metabolism, synaptic transmission and nuclear transport lead to synaptic damage and eventually, to synaptic loss

hyperinsulinemia, insulin will preferably bind IDE, diminishing A β clearance and promoting its oligomerization into insoluble aggregates. On the other hand, AD pathology will increase synapse insulin dysfunction through A β binding to the IR [47], increasing extracellular insulin that will occupy IDE, in a vicious cycle (Figure 3). Additionally, InsRes may lead to activation of GSK3 β , one of the kinases responsible for tau hyperphosphorylation found in AD. This phosphorylation could contribute to the insolubility and aggregation of tau, aggravating the formation of NFTs already present in AD. Although the pathophysiology of AD is a matter of intense study, a promising area of research concerns the elucidation of abnormal spatiotemporal integration of metabolic signals, particularly those downstream of PI3-K/Akt/mTOR activity. In line with this, it has been found a bidirectional

modulation of the APP metabolism by insulin in neuroblastoma cells: increasing the release of soluble APP [156], reducing intracellular levels of A β 40/42 and increasing A β 40/42 secretion [157]. Additional evidence shows that PI3-K mediates a switch in the expression of neurotrophin receptors, from the high affinity catalytic neurotrophin receptor that binds specifically nerve growth factor, TrkA, to the low affinity neurotrophin receptor, p75NTR. The latter favours sphingomyelinase activity, ceramide production and the stabilization of β site of the APP cleaving enzyme, suggesting that A β production depends on growth factors and the cell metabolic state [158]. Several lines of evidence suggest that hyperglycaemia is associated with cognitive impairment and with structural alterations in the brain [159]. Prolonged hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in diabetes result in the increased production

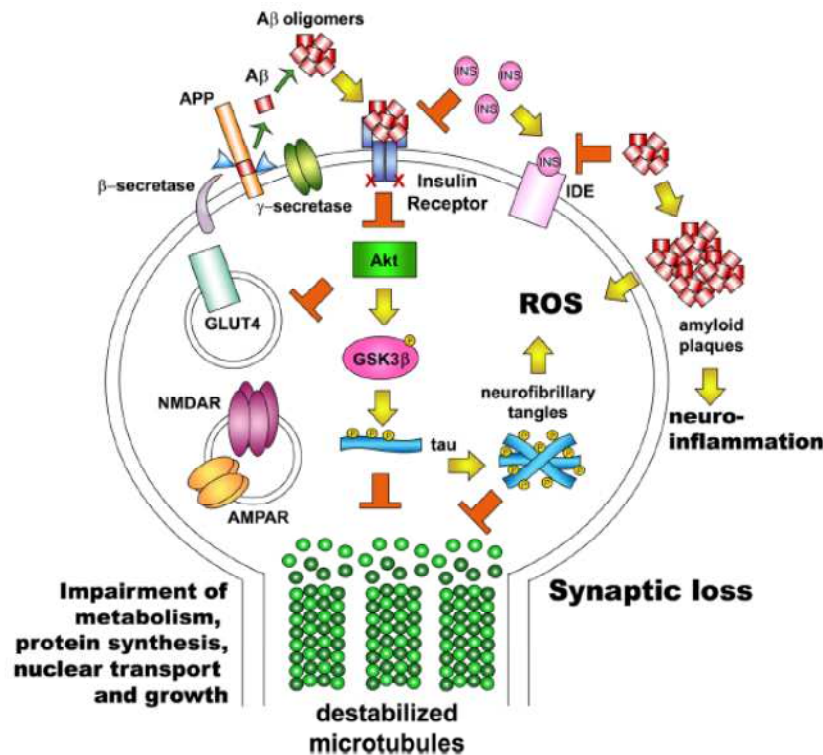


Figure 3. Insulin signalling dysfunction in the Alzheimer's disease synapse. In the Alzheimer's disease synapse, the amyloidogenic processing of amyloid precursor protein leads to A β peptide accumulation, forming aggregates, and ultimately plaques. Also, hyperphosphorylated tau forms neurofibrillary tangles, which promote neuroinflammation and reactive oxygen species generation. In addition to this, insulin signalling impairment leads to a reduced metabolism and glutamate neurotransmission, as well as an additional increase in tau phosphorylation via GSK3 β activation. A β and insulin compete for binding to the insulin receptor and to the insulin degrading enzyme, which leads to an increased synaptic insulin resistance state and to extracellular A β accumulation. All these effects aggravate the metabolic and synaptic dysfunction and lead to synaptic loss

and accumulation of advanced glycation end products [130]. It has been reported that levels and activities of proteins of the IR/PI3-K/Akt signalling pathway are decreased in the autopsied frontal cortices from AD, T2DM and T2DM-AD patients, particularly in IRS-1 and Akt [160,161]. The PI3-K/mTOR pathway also plays an important role in autophagy, a catabolic process that helps to maintain cellular homeostasis. The regulation of autophagy is intimately associated with the control of cell growth, cell proliferation, survival and death. Impairment of autophagy has also been demonstrated in neurodegenerative diseases, in which proteins inclusion and damaged organelles are present inside the neurons [162]. It is of interest the recent finding that the hormone glucagon-like peptide-1 facilitates insulin signalling, opening the possibility of using analogues of this hormone to improve cognition in AD [163,164].

Conclusions

Growing data point that insulin plays a critical role as cognitive modulator. Thus, evidence presented here

strongly suggests that metabolic alterations including obesity, InsRes, metabolic syndrome and T2DM produce systemic and possibly brain InsRes that modify hippocampal physiology increasing the risk of age-associated cognitive impairments, MCI and finally, AD. One of the conclusions obtained from the studies mentioned is that insulin function in the brain could be explained with an inverted U graph: too little insulin (as in type 1 diabetes mellitus and T2DM) or too much insulin (as in metabolic syndrome and InsRes) would have reduced insulin-dependent functions on neurons. Hypoinsulinemia obviously leads to the reduction of insulin signalling because there is no insulin production. Paradoxically, hyperinsulinemia leads to a 'hypoinsulinemic state' in the brain, because it leads to InsRes that ultimately represents the clinical outcomes of impaired insulin-dependent function in the CNS. It is noteworthy to mention that even though InsRes is the medullar pathology of metabolic alterations, there are several metabolic consequences that should be also be taken into consideration when studying the relationship between metabolic alterations and cognitive impairment. Some of them are the following: dyslipidemia, hypercholesterolemia,

altered vascular dynamics and inflammation, among others. It is of utmost importance that the extensive basic research showing the mechanisms behind the association between metabolic alterations and cognitive impairment helps to the early detection and treatment of these patients. The opportune treatment of metabolic alterations focusing on neuroprotection could be employed to delay the onset of cognitive impairment. On the other hand, metabolic-based therapies and drugs could be used in the future in MCI, dementia and AD patients to alleviate their symptoms and treat their diseases in a more comprehensive way.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACYT 166482 and PAPIIT IN204212, UNAM. E. C-O is supported by CONACYT 232879.

Conflicts of interest

None declared.

References

- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, *et al.* Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat fed rats. *Diabetes* 1991; **40**: 1397–1403.
- The state of food and agriculture. Food and agriculture organization of the United Nations, 2013. ISBN 978-92-5-107671-2.
- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011; **378**(9785): 31–40.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* 2007; **87**: 507–520.
- Lind L, Lithell H. Hypertension, hyperlipidemia, insulin resistance and obesity: parts of a metabolic syndrome. *Blood Pres Sup.* 1992; **4**: 49–54.
- Meigs JB. Invited commentary: Insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am. J. Epidemiol.* 2000; **152**: 908–911.
- Umegaki H. Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 2010; **39**: 8–10.
- Schrijvers EMC, Witteman JCM, Sijbrands EJJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease The Rotterdam Study. *Neurology* 2010; **75**: 1982–1987.
- Sima AAF. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 2010; **47**: 279–293.
- Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, *et al.* Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease The Hisayama study. *Neurology* 2010; **75**: 764–770.
- Viscogliosi G, Andreozzi P, Chiriac IM, *et al.* Screening cognition in the elderly with metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2012; **10**: 358–362.
- Craft S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer Res.* 2007; **4**: 147–152.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 2010; **31**: 224–243.
- Ciobica A, Padurariu M, Bild W, Stefanescu C. Cardiovascular risk factors as potential markers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Psychiatr. Danub.* 2011; **23**(4): 340–6.
- Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. In Vecsei L, ed. *Frontiers in Clinical Neuroscience: Neurodegeneration and Neuroprotection: A Symposium in Abel Lajtha's Honour 2004*; 135–152.
- Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol.* 2013; **47**: 145–171.
- Adamo ML, Shemer J, Roberts CT Jr, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor-1 induced phosphorylation in neurally derived cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993 Aug 27; **692**: 113–25.
- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci.* 1999; **19**: 7300–7308.
- Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, *et al.* Localization and characterization of insulin-receptors in rat-brain and pituitary-gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 1987; **121**: 1562–1570.
- Havrankova J, Roth J. Insulin receptors are widely distributed in central nervous-system of rat. *Nature* 1978; **272**: 827–829.
- Zhao WQ, Chen H, Xu H, *et al.* Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 34893–34902.
- Margolis R, Altzuler A. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 1967; **215**: 1375–1376.
- Baura GD, Foster DM, Porte D, *et al.* Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in-vivo: a mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest.* 1993; **92**: 1824–1830.
- Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 2003; **9**: 795–800.
- Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J. Neurochem.* 2006; **99**: 524–36.
- Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Therap.* 2012; **136**: 82–93.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene-expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 8445–8454.
- Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul. Pept.* 1993; **48**: 55–63.
- Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res.* 1996; **736**: 16–27.
- Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, *et al.* Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first

- approaches to its role and regulation. *J. Neuroendocrinol.* 2008; **20** (10): 1176–90.
31. Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol. Med.* 2011; **3**(12): 742–54.
 32. Bingham EM, Hopkins D, Smith D, et al. The role of insulin in human brain glucose metabolism - an (18)fluorodeoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 2002; **51**: 3384–3390.
 33. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; **490**(1–3): 71–81.
 34. Huang TJ, Verkhratsky A, Fernyhough P. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005; **28**: 42–54.
 35. Duarte AI, Proenca T, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes* 2006; **55**: 2863–2870.
 36. Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 beta signaling pathways and changes in protein expression. *BBA-Mol Cell Res.* 2008; **1783**: 994–1002.
 37. Skeberdis VA, Lan JY, Zheng X, Zukin RS, Bennett MVL. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; **98**: 3561–3566.
 38. van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GMJ. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J. Neurochem.* 2005; **94**: 1158–1166.
 39. Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res.* 1983; **260**: 330–333.
 40. Boyd FT, Clarke DW, Muther TF, Raizada MK. Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 5880–5884.
 41. Wan Q, Xiong ZG, Man HY, et al. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature.* 1997; **14**: 388(6643): 686–90.
 42. Cid MP, Arce A, Salvatierra NA. Acute stress or systemic insulin injection increases flunitrazepam sensitive-GABAA receptor density in synaptosomes of chick forebrain: modulation by systemic epinephrine. *Stress* 2008; **11**: 101–7.
 43. Chiu S-L, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 2010; **5**. DOI:10.1186/1749-8104-5-7
 44. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; **19**:490: 13–24.
 45. Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 2009; **1296**: 35–45.
 46. Heras-Sandoval D, Ferrera P, Arias C. Amyloid-beta protein modulates insulin signaling in presynaptic terminals. *Neuroch Res.* 2012; **37**: 1879–1885.
 47. Wang JL, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng ZH, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 2001; **50**: 2786–2791.
 48. Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 32345–32353.
 49. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol. Behav.* 2000; **68**(4): 509–14.
 50. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J. Neurosci.* 2009; **29**(20): 6734–51.
 51. Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, Born J, Kern W. Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology* 2007; **86**: 136–142.
 52. Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 2001; **74**(4): 270–80.
 53. Shemesh E, Rudich A, Haman-Boehm I, Cukierman-Yaffe T. Effect of intranasal insulin on cognitive function: a systematic review. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; **97**(2): 366–76.
 54. Krug R, Benedict C, Born J, Hallschmid M. Comparable sensitivity of postmenopausal and young women to the effects of intranasal insulin on food intake and working memory. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; **95**: E468–E472.
 55. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Born J, Kern W. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes.* 2008; **32**: 275–278.
 56. Reger MA, Watson GS, Green PS, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J Alzheimer Dis.* 2008; **13**: 323–331.
 57. Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L, et al. Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study. *Br. Med. J.* 1997; **315**: 1045–1049.
 58. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006; **23**: 3375–3384.
 59. Sui L, Wang J, Li B-M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* 2008; **15**: 762–776.
 60. Convit A, Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; **100**: 2019–2022.
 61. Steen E, Terry BM, Rivera EJ, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - is this type 3 diabetes? *J Alzheimer Dis.* 2005; **7**: 63–80.
 62. Ronnemaa E, Zethelius B, Sundelof J, et al. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2008; **71**: 1065–1071.
 63. Frisardi V, Imbimbo BP. Metabolic-cognitive syndrome: metabolic approach for the management of Alzheimer's disease risk introduction. *J Alzheimer Dis.* 2010; **30**: S1–S4.
 64. Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, et al. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology* 2011; **77**: 1126–1134.
 65. de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2012; **9**: 35–66.
 66. Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J. Neural Transm.* 1998; **105**: 415–422.
 67. Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, et al. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 2012; **9**: 399–417.
 68. Burns JM, Honea RA, Vidoni ED, Hutfler LJ, Brooks WM, Swerdlow RH. Insulin is differentially related to cognitive decline and atrophy in Alzheimer's disease and aging. *BBA- Mol Bas Dis.* 1822; **2012**: 333–339.
 69. Xu W, Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The effect of borderline diabetes on the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Diabetes* 2007; **56**: 211–216.
 70. Pavlik V, Massman P, Barber R, Doody R, Tarcc. Differences in the association of peripheral insulin and cognitive function in non-diabetic Alzheimer's disease cases and normal

- controls. *J Alzheimer Dis.* 2013; **34**: 449–456.
71. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2005; **62**: 1556–1560.
 72. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Br. Med. J.* 2005; **330**: 1360–1362B.
 73. Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP Jr, Zhou J, Yaffe K. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr. Alzheimer Res.* 2007; **4**: 103–109.
 74. Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* 2008; **71**: 1057–1064.
 75. Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 2003; **163**: 1524–1528.
 76. Kalmijn S, Foley D, White L, et al. Metabolic cardiovascular syndrome and risk of dementia in Japanese-American elderly men: the Honolulu-Asia aging study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; **20**: 2255–2260.
 77. Vanhanen M, Koivisto K, Kuusisto J, et al. Cognitive function in an elderly population with persistent impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1998; **21**: 398–402.
 78. Yaffe K, Haan M, Blackwell T, Cherkasova E, Whitmer RA, West N. Metabolic syndrome and cognitive decline in elderly Latinos: findings from the Sacramento Area Latino Study of Aging study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2007; **55**: 758–762.
 79. Dik MG, Jonker C, Comijs HC, et al. Contribution of metabolic syndrome components to cognition in older individuals. *Diabetes Care* 2007; **30**: 2655–2660.
 80. van den Berg E, Biessels GJ, de Craen AJM, Gussekloo J, Westendorp RGJ. The metabolic syndrome is associated with decelerated cognitive decline in the oldest old. *Neurology* 2007; **69**: 979–985.
 81. Roriz-Cruz M, Rosset I, Wada T, et al. Cognitive impairment and frontal-subcortical geriatric syndrome are associated with metabolic syndrome in a stroke-free population. *Neurobiol. Aging* 2007; **28**: 1723–1736.
 82. Raffaitin C, Gin H, Empana JP, et al. Metabolic syndrome and risk of Alzheimer's disease or vascular dementia incident: study within the cohort 3C. *Diabetes Metab.* 2009; **35**: A48–A49.
 83. Solfrizzi V, Scafato E, Capurso C, et al. Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian Longitudinal Study on Ageing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2010; **81**: 433–440.
 84. Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, et al. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 1997; **145**: 301–308.
 85. Vanhanen M, Koivisto K, Moilanen L, et al. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology* 2006; **67**: 843–847.
 86. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HAP, Hofman A, Breteler MMB. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology* 1999; **53**: 1937–1942.
 87. Gregg EW, Yaffe K, Cauley JA, et al. Is diabetes associated with cognitive impairment and cognitive decline among older women? *Arch. Intern. Med.* 2000; **160**: 174–180.
 88. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2004; **63**: 1187–1192.
 89. Luchsinger JA, Tang MX, Stern Y, Shea S, Mayeux R. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am. J. Epidemiol.* 2001; **154**: 635–641.
 90. Grodstein F, Wilson RS, Chen J, Manson JE. Type 2 diabetes and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Diabetes Care* 2001; **24**: 1060–1065.
 91. Kanaya AM, Barrett-Connor E, Gildengorin G, Yaffe K. Change in cognitive function by glucose tolerance status in older adults - A 4-year prospective study of the Rancho Bernardo Study Cohort. *Arch. Intern. Med.* 2004; **164**: 1327–1333.
 92. Yaffe K, Blackwell T, Kanaya AM, Davidowitz N, Barrett-Connor E, Krueger K. Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. *Neurology* 2004; **63**: 658–663.
 93. Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, et al. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA-J Am Med Assoc.* 2004; **292**: 2237–2242.
 94. Beeri MS, Goldbourt U, Silverman JM, et al. Diabetes mellitus in midlife and the risk of dementia three decades later. *Neurology* 2004; **63**: 1902–1907.
 95. Xu W, Caracciolo B, Wang H-X, et al. Accelerated progression from mild cognitive impairment to dementia in people with diabetes. *Diabetes* 2010; **59**: 2928–2935.
 96. Blagosklonny MV. Aging and immortality - quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2087–2102.
 97. Freude S, Plum I, Schnitker J, et al. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes* 2005; **54**: 3343–3348.
 98. Maesako M, Uemura K, Kubota M, et al. Insulin regulates Presenilin 1 localization via PI3K/Akt signaling. *Neurosci Lett.* 2010; **483**: 157–161.
 99. Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 2002; **112**: 803–814.
 100. Winocur G, Greenwood CE. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiol. Aging* 2005; **26**: S46–S49.
 101. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur. J. Neurol.* 2006; **13**: 1385–1388.
 102. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, et al. Diet-induced insulin resistance impairs Hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008; **18**: 1085–1088.
 103. Granholm A-C, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimer Dis.* 2008; **14**: 133–145.
 104. Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, et al. Obesity and Hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 2008; **149**: 2628–2636.
 105. Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol. Behav.* 2009; **8**: 96(1): 1–5.
 106. Boitard C, Erchamendy N, Sauviant J, et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 2012; **22**: 2095–2100.
 107. Valladolid-Acebes I, Merino B, Principato A, et al. High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012; **302**: E396–E402.
 108. Freeman LR, Granholm AC. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012; **32**(4): 643–653.
 109. McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2010; **93**: 546–553.
 110. Shie FS, Jin LW, David GC, Leverenz JB, LeBoeuf RC. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 2002; **13**: 455–459.
 111. Puig KL, Floden AM, Adhikari R, Golovko MY, Combs CK. Amyloid precursor protein and proinflammatory changes are regulated in brain and

- adipose tissue in a murine model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One* 2012; 7.
112. Levin-Allerhand JA, Smith JD. Ovariectomy of young mutant amyloid precursor protein transgenic mice leads to increased mortality. *J. Mol. Neurosci.* 2002; 19: 163–166.
 113. Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 36275–36282.
 114. Studzinski CM, Li F, Bruce-Keller AJ, et al. Effects of short-term Western diet on cerebral oxidative stress and diabetes related factors in APP x PS1 knock-in mice. *J. Neurochem.* 2009; 108: 860–866.
 115. Julien C, Tremblay C, Phivilay A, et al. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol. Aging* 2010; 31: 1516–1531.
 116. Van Dyke K, Jabbour N, Hoeldtke R, Van Dyke C, Van Dyke M. Oxidative/nitrosative stresses trigger type I diabetes: preventable in streptozotocin rats and detectable in human disease. In: Laskin DL, ed. *Oxidative/Nitrosative Stress Dis*, 2010:138–145.
 117. Biessels GJ, Kamal A, Urban LJA, Spruijt BM, Erkens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* 1998; 800: 125–135.
 118. Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 26;97(20): 11056–61.
 119. Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci.* 2008; 11: 309–317.
 120. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S. Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 2012; 229: 378–383.
 121. Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GVW, Jope RS. Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes* 2006; 55: 3320–3325.
 122. Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, et al. Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci.* 2007; 27: 13635–13648.
 123. Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 2009; 150(12): 5294–301.
 124. Ke YD, Delerue F, Gladbach A, Götz J, Ittner LM. Experimental diabetes mellitus exacerbates tau pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2009; 19;4(11): e7917
 125. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of beta-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012; 7(3): e32792.
 126. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 1998; 112: 1199–1208.
 127. Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, De la Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 2006; 9: 13–33.
 128. Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *J. Neurochem.* 2006; 96: 1005–1015.
 129. Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav. Brain Res.* 1999; 102: 73–88.
 130. Deng Y, Li B, Lu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of Tau and neurofilaments in the brain implication for Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 2009; 175: 2089–2098.
 131. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* 2007; 101(3): 757–70.
 132. Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol. Aging* 2012; 33(2): 430.e5–18.
 133. de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 2006; 10: 89–109.
 134. Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology* 2009; 56(4): 779–801.
 135. Henneberg N, Hoyer S. Desensitization of the neuronal insulin-receptor – a new approach in the ethiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer-type (SDAT). *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1995; 21: 63–74.
 136. Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893: 290–3.
 137. Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. Beta-amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 2002; 176: 163–174.
 138. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimer Dis.* 2005; 8: 247–268.
 139. Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp. Neurol.* 2006; 200: 496–508.
 140. Zucker LM, Antoniadis H. Insulin and obesity in Zucker genetically obese rat fatty. *Endocrinology* 1972; 90: 1320.
 141. Chan TM, Young KM, Hutson NJ, Brumley FT, Exton JH. Hepatic metabolism of genetically diabetic (db/db) mice. 1. Carbohydrate metabolism. *Am. J. Physiol.* 1975; 229: 1702–1712.
 142. Kodama H, Fujita M, Yamaguchi I. Development of hyperglycemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KSJ db/db) mice. *Diabetologia* 1994; 37: 739–744.
 143. Srinivasan K, Ramamo P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J. Med. Res.* 2007; 125: 451–472.
 144. Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature* 1994; 372: 425–432.
 145. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763–770.
 146. Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 2002; 113: 607–615.
 147. Gerges NZ, Aleisa AM, Alkadhi KA. Impaired long-term potentiation in obese Zucker rats: possible involvement of presynaptic mechanism. *Neuroscience* 2003; 120: 535–539.
 148. Alzoubi KH, Aleisa AM, Alkadhi KA. Impairment of long-term potentiation in the CA1, but not dentate gyrus, of

- the hippocampus in obese Zucker rats. *J. Mol. Neurosci.* 2005; **27**: 337–346.
149. Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, et al. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav. Neurosci.* 2005; **119**: 1389–1395.
 150. Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer Dis.* 2009; **16**: 741–761.
 151. Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and a beta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; **107**: 7036–7041.
 152. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000; **289**: 2122–2125.
 153. Schubert M, Gautam D, Surjo D. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; **2**:101(9): 3100–5.
 154. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 1998; **4**:273(49): 32730–8.
 155. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J. Neurosci.* 2002; **22**(10): RC221.
 156. Solano DC, Sironi M, Bonfini C, Solerte SB, Govoni S, Racchi M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *FASEB J.* 2000; **14**: 1015–1022.
 157. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, et al. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Neurosci.* 2001; **21**: 2561–2570.
 158. Costantini C, Scrabble H, Puglielli L. An aging pathway controls the TrkA to p75(NTR) receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 2006; **25**: 1997–2006.
 159. Biessels GJ, Kappelle LJ. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem. Soc. Trans.* 2005; **33**: 1041–1044.
 160. Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J. Pathol.* 2011; **225**: 54–62.
 161. Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012; **122**: 1316–1338.
 162. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem.* 2004; **263**: 55–72.
 163. McClean PL, Gault VA, Harriott P, Hoelscher C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; **630**: 158–162.
 164. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *J. Clin. Invest.* 2012; **2**:122(4): 1339–53.

Planteamiento del problema

A pesar de que se conocen las consecuencias perjudiciales de la obesidad y resistencia a la insulina sistémica sobre la memoria y la cognición, se desconoce si éstas se asocian con cambios en la sensibilidad a insulina hipocampal. Adicionalmente, aunque se han descrito algunos efectos de las dietas HFFD a largo plazo en el hipocampo, se desconoce el impacto que tiene la administración de HFFD a corto plazo sobre la estructura y función del hipocampo.

Importancia del proyecto

México ocupa el primer y segundo lugar mundial en prevalencia de obesidad infantil y adulta, respectivamente, lo que coloca el estudio de las causas y consecuencias de esta epidemia como prioritario para entender sus implicaciones en salud, su papel en la fisiopatología de una gran cantidad de enfermedades crónico-degenerativas y desarrollar enfoques farmacológicos más racionales y efectivos. En este sentido, a pesar de la prevalencia creciente y del claro efecto dañino para los individuos y la sociedad, todavía no se conoce el impacto que el consumo de dietas hipercalóricas, asociadas con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, tienen sobre sistemas de alta tasa metabólica y gran plasticidad como es el sistema nervioso central. De hecho, trabajo experimental y estudios epidemiológicos apuntan a la presencia de resistencia cerebral a la insulina como un evento central de la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer. Sin embargo ningún trabajo ha abordado el análisis del impacto a corto plazo que el consumo de dietas altas en grasa y fructosa (que emula en buena medida el tipo de dieta hipercalórica del mexicano), en el desarrollo de resistencia a insulina en el hipocampo, una de las regiones de mayor plasticidad cerebral y una de las más vulnerables al daño en la EA.

Es por ello que el presente trabajo presentamos un modelo de estudio de desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina cerebral asociado con cambios estructurales y bioquímicos en esta región que permitirá ahondar en el conocimiento sobre el control del metabolismo sistémico y la función cerebral mediados por insulina.

Hipótesis

La administración subaguda de una dieta alta en grasa y fructosa inducirá cambios en la sensibilidad a la insulina en el hipocampo, la cual estará asociada a modificaciones morfológicas, estructurales, bioquímicas y funcionales que se relacionen con la pérdida de plasticidad en esta región.

Objetivo general

Evaluar las alteraciones de la vía de la insulina en el hipocampo en un modelo de obesidad y resistencia a la insulina sistémica debida a la ingesta subaguda de una dieta alta en grasa y fructosa (HFFD), así como estudiar modificaciones neuronales y gliales asociadas a la pérdida de plasticidad, debidas al consumo de esta dieta.

Objetivos particulares

Desarrollar un modelo de obesidad y resistencia a insulina sistémica debida a la administración subaguda de HFFD en ratas. Evaluar:

1. Alteraciones en la vía de señalización de la insulina IRS-1/PI3-K/Akt en el hipocampo.
2. Activación de la vía mTOR/S6K por la administración de altas grasas y azúcares.
3. Impacto funcional de la resistencia a la insulina hipocampal, mediante determinación de la actividad mitocondrial sináptica en respuesta a la insulina.
4. Cambios morfológicos neuronales relacionados con pérdida de la plasticidad hipocampal.
5. Alteraciones en proteínas estructurales asociadas al citoesqueleto asociadas a cambios morfológicos y a las alteraciones metabólicas encontradas.
6. Marcadores de inflamación hipocampal relacionados con la obesidad.

Materiales y métodos

Animales y dietas – Los animales fueron manejados de acuerdo a las reglas del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IBB. Se utilizaron ratas macho de la cepa SpragueDawley de 250-270g (Harlan, Facultad de Química, UNAM). Las ratas fueron almacenadas en condiciones estándar con ciclos de 12 horas de luz/obscuridad y fueron divididas en dos grupos y alimentadas durante 7 días como se describe a continuación: el grupo control (ctrl) (n=30) fue alimentado con chow estándar de roedor (3kcal/g, Harlan) y agua, mientras el grupo de dieta alta en grasa (HFD) (n=30) fue alimentado con chow estándar de roedor complementado con 10% de manteca animal (5.4 kcal/g Bio-Serv) y agua complementada con 20% de jarabe de alta fructosa (0.83 kcal/ml, miel de maíz Karo). Todas las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a la comida y agua. Algunos animales de ambos grupos recibieron un bolo de insulina intraperitoneal. En todos los casos, removimos la comida de las jaulas en la mañana de los experimentos. Después de 5 horas de ayuno, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (80mg/kg) y sacrificadas. A las ratas que recibieron bolo de insulina se les aplicó una inyección intraperitoneal de insulina (5U/kg) después de la anestesia, y fueron decapitadas 15 min después de recibir el bolo.

Determinación de la glucosa, insulina y leptina séricas – Se obtuvo sangre de los animales posterior a su decapitación. Se recolectó suero por centrifugación y se almacenó a -20°C. Para la determinación de la concentración de glucosa se utilizó un medidor de glucosa estándar OneTouch Ultra. Se realizaron determinaciones de concentración de insulina y leptina por duplicado mediante un radioinmunoensayo de fase sólida I125. La sensibilidad del ensayo fue de 0.04 ng/ml para la insulina y de 0.08 ng/ml para leptina. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 4% y 6%, respectivamente.

Obtención de lisados y Western blot – Las ratas fueron anestesiadas y decapitadas como está descrito previamente. Se extrajeron los hipocampos y se congelaron los tejidos inmediatamente a -20°C. Se realizó un homogenado mecánico, posteriormente se lisaron los tejidos por 20 min. y se sonicaron con 20 pulsos de 1 seg a 4°C en buffer de lisis RIPA

complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 RPMs por 15 min a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes. Se determinó la concentración de proteína de las muestras usando un kit de BCA. Los lisados fueron hervidos con buffer Laemmli y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles de 10% acrilamida. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en condiciones estándar. Las membranas fueron bloqueadas con TBS-t 5% leche descremada y posteriormente se incubaron con alguno de los siguientes anticuerpos primarios a 4°C toda la noche: anti-pIR (1:1,000); anti-pIRS-1 (1:250); anti-pAkt (1:1,000); anti-pS6K (1:250); anti-pTau (1:2,000); anti-SYP (1:1,000); anti-tubulina (1:30,000). Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, según el caso (anti-mouse IgG o anti-rabbitIgG HRP-conjugated). Finalmente, se revelaron las membranas con un kit de bioluminiscencia en placas Kodak X-Omat. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas y para normalizar los datos, se dividieron los valores obtenidos de cada banda con su respectivo control de carga y se obtuvo una relación. Este valor fue convertido a porcentaje del control en cada experimento.

Obtención de sinaptosomas – Se decapitó a las ratas sin previa anestesia y se obtuvieron los hipocampos. Para obtener la fracción sinaptosomal se utilizó el método de Löscher modificado (Heras-Sandoval et al. 2012). Brevemente, se homogenizaron los hipocampos en una solución de sacarosa 0.32 M y HEPES pH 7.2 y posteriormente se centrifugaron a 1000 g por 10 mins. El sobrenadante se depositó sobre una solución de sacarosa 1.2M y se centrifugaron las muestras a 32,500 g por 30 mins. Posteriormente se colectó la interfase del gradiente y se diluyó en una solución de sacarosa 0.32 M a un volumen final de 2 ml. Esta solución se depositó sobre 1 ml de sacarosa 0.8 M y se centrifugó por 30 min a 32,500 g. el botón sináptico obtenido se resuspendió en 2 ml de solución de Locke pH 7.2. Finalmente, se tomaron alícuotas de 200 µl de cada grupo y se realizaron ensayos de reducción de MTT. Todo este protocolo se llevó a cabo a 4°C y sobre hielo. A los grupos tratados con insulina se les agregó insulina 100nm y se incubó en agitación durante 15 mins a 37° C.

Determinación de la reducción de MTT – Para evaluar la función mitocondrial se examinó la actividad redox mitocondrial a través de la conversión de las sales de bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico o MTT, a cristales de formazán al ser reducidos por la cadena respiratoria mitocondrial. Se disolvió el MTT en PBS a una concentración de 5 mg/ml y se agregó a los sinaptosomas al 10% (v/v). Se dejó incubar durante 45 mins. A 37°C en agitación y posteriormente los sinaptosomas se centrifugaron a 15,000 rpm por 5 min, se removió el sobrenadante y se agregaron 500 µl de isopropanol ácido. Se cuantificó la absorbancia de cada muestra leyendo a 570 nm en un espectrofotómetro.

Histología e inmunohistoquímica – Las ratas fueron perfundidas transcárdialmente con buffer de fosfatos (PBS) y paraformaldehído al 4%. Se removieron los cerebros y se guardaron a 4°C en paraformaldehído. Posteriormente, los cerebros fueron colocados en soluciones de sacarosa al 20% y 30% por 24 h cada una y cortados coronalmente en secciones de 30 µm utilizando un criostato a -20°C. Las rebanadas coronales se incubaron a temperatura ambiente en flotación con PBS/0.25% Triton X-100 y 0.3% H₂O₂ por 30 min. y posteriormente se fijaron por 2 hrs. con PBS/5% BSA. Posteriormente, las rebanadas se incubaron toda la noche a 4°C en solución de fijado con los siguientes anticuerpos: anti-GFAP (1:500), anti-Iba1 (1:250), anti-MAP-2 (1:500). Después de la incubación, se lavaron las rebanadas tres veces con PBS por 5 min. y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo biotilado (1:500) del kit Vector. Finalmente, se utilizó el kit ACB-biotina-avidina-peroxidasa de Vector y se reveló la reacción con tetrahidroclorato de diaminobencidina como sustrato de la peroxidasa. Todas las imágenes fueron capturadas con una cámara digital montada en un microscopio Zeiss, Axioskop 40.

Densitometría de MAP-2 y cuantificaciones de GFAP – Para la densitometría de MAP-2 se tomaron tres o cuatro secciones de 100µm x 100µm de imágenes tomadas a 20x del estrato piramidal de CA1 y de la capa granular del giro dentado. Se calculó la intensidad de

pixel promedio en estas secciones de forma automática utilizando ImageJ. Para el conteo de células GFAP positivas, se contaron de forma manual los astrocitos presentes en cuatro secciones diferentes por animal, de imágenes tomadas a 20x en el estrato radiado de CA1 y en el giro dentado. Las células se contaron cuando sus procesos fueran completos y se observaran claramente los núcleos. Para el cálculo del área se utilizó ImageJ, se usaron ampliaciones 40x y se seleccionó de forma manual la forma de cada astrocito para el conteo.

Tinción de Golgi, análisis de Sholl y conteo de espinas dendríticas – Se utilizó el kit FD Rapid Golgi Stain y se siguieron las instrucciones del proveedor. Se obtuvieron rebanadas coronales de 150µm utilizando un vibratomo. Para el análisis de Sholl, se obtuvieron trazos de neuronas individuales obtenidas a magnificaciones 20x y se usó un plug-in de ImageJ para el análisis automático (<http://labs.biology.ucsd.edu/ghosh/software/>). Para el conteo de espinas dendríticas, se obtuvieron imágenes a 40x y se contaron segmentos de 10µm de longitud. Se seleccionaron sólo dendritas secundarias y terciarias y se realizó el conteo de espinas de forma manual. No se contaron más de tres segmentos en la misma dendrita. Ambos análisis fueron llevados a cabo en un análisis de doble-ciego.

Análisis estadístico – Los resultados representan el promedio \pm SEM. Se realizaron comparaciones entre grupos utilizando el análisis de t de Student no pareado y ANOVA de dos vías con un test post hoc de Tukey. La correlación de los niveles de insulina y leptina séricos se realizó con la prueba de Spearman. La correlación del peso hipocampal con la ingesta calórica de cada rata fue determinada con una regresión lineal. Una $p < 0.05$ fue considerada significativa. Se utilizó GraphPad 6 para las gráficas y el análisis estadístico.

Resultados I. Modelo *in vivo* de administración subaguda de dietas altas en grasa y fructosa en ratas

“Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations, dendritic and synaptic loss and astroglial response in the rat hippocampus”

Calvo-Ochoa Erika, Hernández-Ortega Karina, Ferrera Patricia, Morimoto Sumiko, Arias Clorinda. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2014. 34(6):1001-8. doi: 10.1038/jcbfm.2014.48.

Desarrollo y validación de un modelo de obesidad y resistencia a insulina sistémica debida a la administración subaguda de dietas alta en grasa y fructosa (HFFD) en ratas

Para el desarrollo del modelo nos basamos en estudios previos que reportan que 3 días de alimentación con HFFD producen resistencia a la insulina hepática, y que 7 días producen resistencia a la insulina sistémica (Wang et al., 2001; Samuel et al., 2004). Se alimentaron ratas macho Sprague Dawley jóvenes de 240 – 260 g durante siete días *ad libitum* con una dieta control (ctrl) consistente en chow para roedor (Harlan 2018S) y agua bidestilada, o con una dieta alta en grasa y fructosa (HFFD) que consistió en chow para roedor complementado con 10% de manteca animal (BioServ) y agua complementada con 20% de jarabe de alta fructosa (miel de maíz comercial). Los valores nutrimentales de ambas dietas se presentan en la Tabla 1.

	ctrl	HFFD
Contenido energético chow	3 Kcal/g	5.4 Kcal/g
Contenido energético agua	0 Kcal/ml	0.832 Kcal/ml

Tabla 1. Dietas utilizadas

Posteriormente se determinó el estado metabólico de los animales control mediante la evaluación de parámetros nutricionales, metabólicos y hormonales. Encontramos que la ingesta de HFFD por 7 días produce hiperfagia, obesidad y resistencia a la insulina sistémica. El grupo HFFD consumió más alimento (43.8%, $p < 0.05$) y agua (33%, $P < 0.05$) que los controles, resultando en un incremento significativo de la ingesta calórica (254%, $P < 0.001$), y ganancia de peso (132%, $P < 0.001$) (Figura 4).

Adicionalmente, estudiamos la sensibilidad sistémica a la insulina en las ratas mediante la determinación de la captura de glucosa inducida por insulina. Para ello se midieron los niveles de glucosa séricos en ayuno en condiciones basales y 15 minutos después de la inyección de un bolo de insulina intraperitoneal (5 U/kg) (Figura 5).

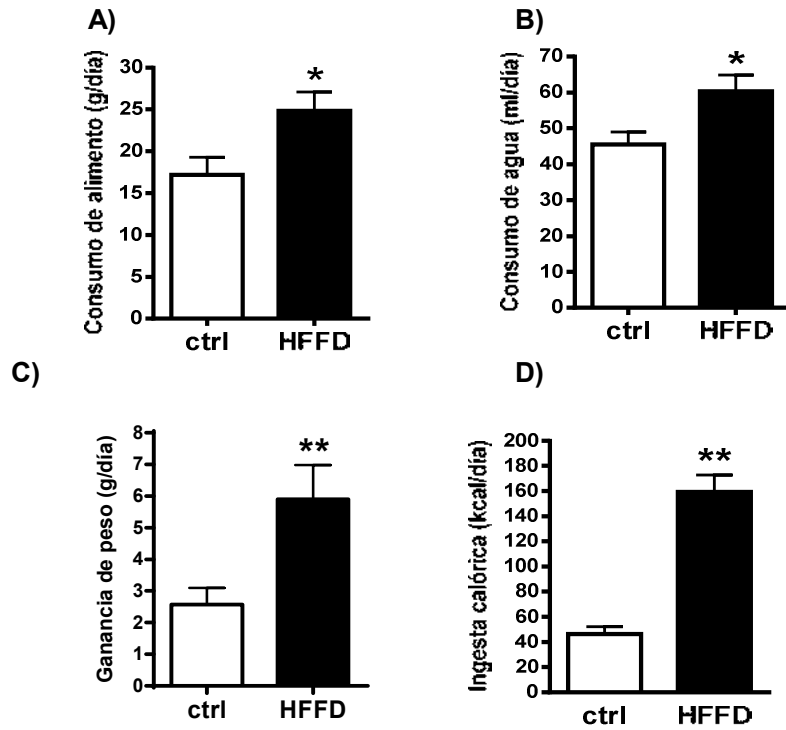


Figura 4. Evaluación de parámetros nutricionales. Determinación de: A) consumo de alimento, B) consumo de agua, C) ingesta calórica y D) ganancia de peso en ratas control y HFFD. Se muestra el promedio y el error estándar. n=10-12 ratas por grupo. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. ctrl.

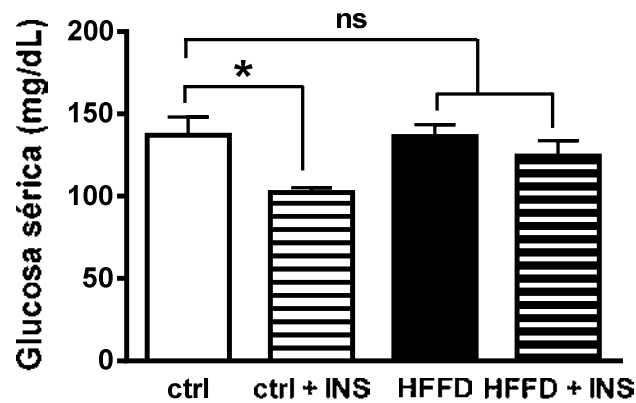


Figura 5. Determinación de la captura de glucosa sérica. Concentración de la glucosa sérica en animales ayunados en estado basal (ctrl) y en animales tratados con un bolo de insulina intraperitoneal de 5 U/kg por 15 min. (+INS). Se muestra el promedio y el error estándar. n=6-10 ratas por grupo. ns: no significativo, * P < 0.05 vs. ctrl. ns: no significativo.

En primer lugar encontramos que los niveles basales de glucosa en ayuno no difieren entre grupos. Posteriormente, observamos que la administración de insulina por 15 minutos disminuye los niveles séricos de glucosa de forma significativa en las ratas control (24.7%, $P < 0.05$) pero no así en las ratas HFFD (9%, ns). Lo anterior sugiere que las ratas HFFD presentan una disminución sistémica en la sensibilidad a la insulina.

Para complementar estos datos, determinamos los niveles séricos de dos hormonas metabólicas implicadas en el desarrollo de resistencia a la insulina sistémica: insulina y leptina. Encontramos que no hubo cambios significativos en los niveles séricos de insulina en las ratas HFFD (55.3%, ns). Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de que no se obtuvo significancia estadística, se observan diferencias en la distribución de los grupos, donde algunas de las ratas HFFD presentan valores más altos de insulina sérica (Figura 6). Por el otro lado, observamos que los niveles séricos de leptina aumentaron de forma significativa en las ratas HFFD comparadas con las controles (94.5%, $P < 0.001$). Se sabe que en alteraciones metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina los niveles de leptina se encuentran aumentados, y que existe también una resistencia a la leptina a nivel hipotalámico (Sahu, 2003; Munzberg et al. 2004). Adicionalmente, varios grupos han reportado que la relación entre los niveles de insulina y leptina puede usarse como un marcador de alteraciones metabólicas en humanos y en modelos murinos (Silha et al. 2003; Inoue et al. 2006; Baban et al. 2010). En este sentido, encontramos una correlación positiva entre los niveles de ambas hormonas en las ratas HFFD ($r^2=0.6697$, $p=0.028$). En conjunto, estos datos indican que las ratas HFFD desarrollan resistencia a la insulina sistémica.

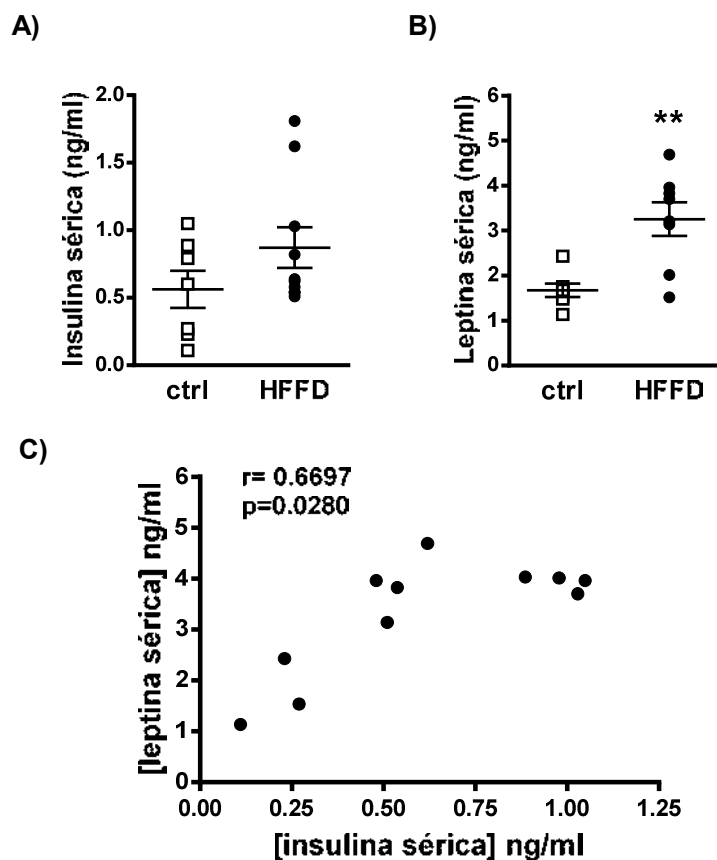


Figura 6. Determinación de los niveles séricos de insulina y leptina. Concentración de A) insulina y B) leptina en animales ayunados. C) Análisis de Spearman en el que se muestra una correlación positiva entre la concentración de los niveles séricos de insulina y leptina en animales ctrl y HFFD. Se muestra el promedio y el error estándar. n=6-10 ratas por grupo. ** P <0.001 vs. ctrl.

La ingesta subaguda de HFFD produce cambios en la sensibilidad a la insulina hipocampal, asociado a activación de la vía de mTOR/S6K

Ya establecido que nuestro modelo de administración de dieta alta en grasa y fructosa por siete días (HFFD) produce obesidad y resistencia a la insulina sistémica, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si también se producían cambios en la sensibilidad a insulina hipocampal. Para ello, estudiamos la activación de diferentes proteínas de la cascada de señalización de la insulina en estado basal (es decir, sin añadir insulina externa

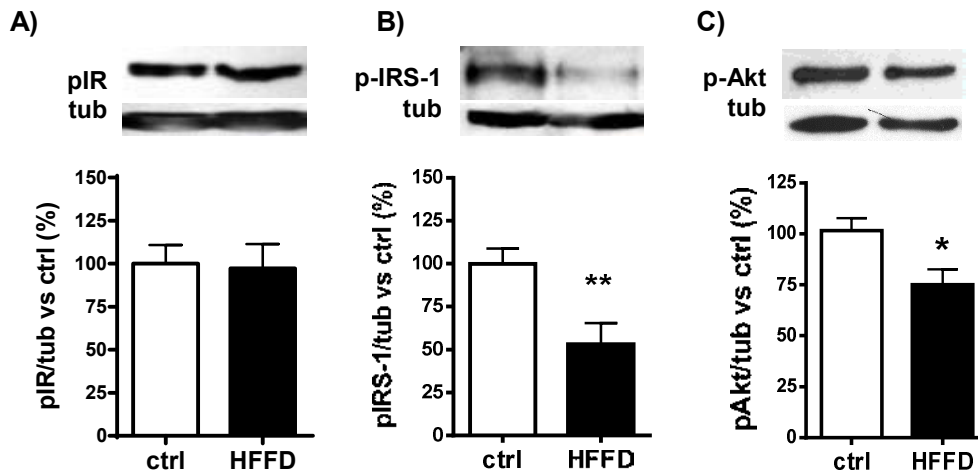


Figura 7. Estudio de la señalización de insulina hipocampal. Western blot de proteínas de la vía de señalización de insulina: (A) p-Y1146-receptor de insulina (pIR), (B) p-Y608-sustrato del receptor de insulina 1 (pIRS-1) y (C) p-S473-Akt. Se muestran western blots representativos así como el histograma del análisis densitométrico. Se graficó el promedio y error estándar. n=6-10 ratas por grupo. *P<0.05, **P<0.01 vs. ctrl.

en el hipocampo de ratas control y HFFD. Para ello, realizamos ensayos de western blot de diferentes proteínas fosforiladas en su sitio de activación. En primer lugar, estudiamos la fosforilación del receptor de insulina (p-IRY1146), y encontramos que no hay diferencias entre los grupos control y HFFD (3%, n.s.) (Figura 7). Lo anterior sugiere que: 1) los niveles de insulina disponibles en el hipocampo son equivalentes en ambos grupos de ratas y 2) los niveles del receptor de insulina, así como su funcionabilidad son equiparables. Posteriormente, examinamos la fosforilación de los efectores de la vía de insulina: IRS-1 (p-IRS-1Y608) y la cinasa Akt (p-AktS473). En ambos casos, encontramos una disminución considerable en la activación de estas proteínas en las ratas HFFD (51%, P<0.001 y 25%, P<0.05, respectivamente). Estos datos indican que la HFFD promueve una resistencia a la insulina hipocampal, ya que a pesar de que existe una activación del receptor de insulina equivalente en los hipocampos de ratas control y HFFD, las proteínas efectoras de la vía de la insulina no se activan eficientemente en las ratas HFFD.

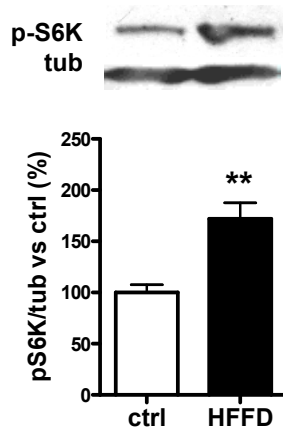


Figura 8. Estudio de la señalización de mTOR/S6K en el hipocampo. Western blot de p-S6KT389. Se muestran western blots representativos así como el histograma del análisis densitométrico. Se graficó el promedio y error estándar. n=10 ratas por grupo. **P<0.01 vs. ctrl.

En búsqueda de un posible mecanismo molecular detrás de la disminución de la sensibilidad a la insulina hipocampal que encontramos, decidimos analizar el estado de activación de la vía mTOR/S6K. Se sabe que esta cinasa promueve la disminución a la sensibilidad a insulina debida a dietas altas en grasas en tejidos como el hígado, músculo y el hipotálamo en el SNC (Ono et al. 2008; Oh et al. 2013). mTOR puede ser activada por diferentes factores de crecimiento, hormonas y nutrientes, entre ellas la insulina. Como ya se describió en la introducción, la vía de mTOR/S6K se encuentra río debajo de Akt cuando es activada por la insulina, pero también puede ser activada directamente por nutrientes. Sin embargo, no existe información sobre el estado de activación de la vía mTOR/S6K en el hipocampo en modelos de dietas altas en grasas. Debido a lo anterior, se analizó el estado de fosforilación del efector de la vía, la cinasa S6K (p-S6KT389) en el hipocampo. Encontramos que existe un aumento significativo en la activación de S6K en las ratas HFFD comparadas con los controles (71.9%, P<0.001) (Figura 8). Esto muestra que en el hipocampo de las ratas HFFD la vía de mTOR/S6K se activa preferencialmente por nutrientes, y no se disminuye su actividad a pesar de que existen fenómenos de resistencia a la insulina hipocampal, lo que sugiere que esta vía pudiera ser la responsable de la resistencia a la insulina hipocampal observada.

La resistencia a la insulina hipocampal producida por HFFD se asocia con disfunción mitocondrial en respuesta a la insulina en sinapsis aisladas del hipocampo

Ya que la dieta HFFD produce una disminución de la respuesta a la insulina en el hipocampo, quisimos explorar las posibles consecuencias funcionales que estos cambios pueden tener en las neuronas hipocampales, de forma particular en las sinapsis. Está bien establecido que la obesidad y la resistencia a la insulina se caracterizan por una disminución en marcadores de actividad y metabolismo mitocondrial (Bonnard et al. 2008; Turner y Heilbronn, 2008; Cheng et al. 2010). Por otro lado, nuestro grupo de investigación reportó que la insulina aumenta la actividad respiratoria mitocondrial en terminales sinápticas aisladas de hipocampo de rata (Heras-Sandoval et al. 2012). Teniendo estos antecedentes, se evaluó si la HFFD modifica la respiración mitocondrial debida a insulina en terminales sinápticas aisladas. Para ello, se realizaron ensayos de respiración mitocondrial por reducción de MTT en sinaptosomas. Nuestros resultados muestran que la insulina aumenta la respiración mitocondrial en las terminales sinápticas aisladas de neuronas de ratas control (18.4% $P < 0.05$) (Figura 9). De forma interesante, en el grupo HFFD no sólo no se observa este aumento en la respiración mitocondrial, sino que se observa una disminución con respecto al control sin insulina (75.4% $P < 0.001$). No se encontraron diferencias entre grupos ctrl y HFFD sin insulina. Estos datos sugieren que la resistencia a la insulina hipocampal producida por la HFFD tiene consecuencias funcionales en las sinapsis a nivel mitocondrial, posiblemente mediante un desacoplamiento mitocondrial que ocurre en presencia de insulina.

La administración de HFFD produce una disminución del peso del hipocampo

Debido a que los déficits cognitivos asociados al consumo de HFFD pueden relacionarse con alteraciones morfológicas y estructurales en las neuronas hipocampales, quisimos evaluar diversos parámetros de integridad, estructura y morfología hipocampal. En primer lugar se observó una reducción significativa en el peso húmedo del hipocampo en el grupo HFFD en comparación con las ratas controles (19.5% $P < 0.05$) (Figura 10).

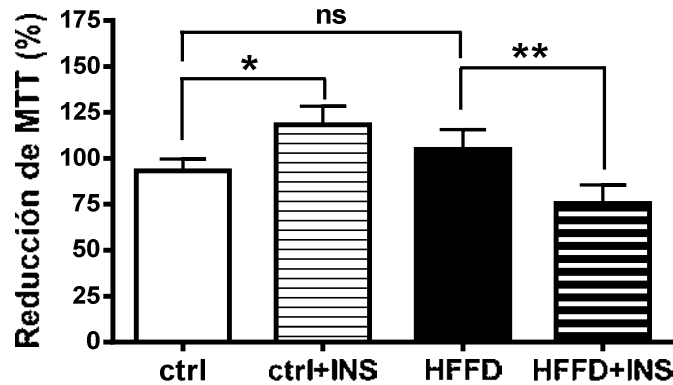


Figura 9. Evaluación de la actividad mitocondrial en sinaptosomas. Se realizó un ensayo de reducción de MTT en sinaptosomas de ratas ctrl. y HFFD, en ausencia y presencia de insulina 100 nm por 15 minutos. Se graficó el promedio y error estándar. n=10 ratas por grupo, por triplicado. *P< 0.05, **P<0.01 vs. ctrl. ns: no significativo.

Adicionalmente, se encontró una correlación positiva entre la disminución del peso hipocampal y la ingesta calórica de cada rata ($r=0.7622$) lo que sugiere que este efecto en la pérdida de peso en el hipocampo se relaciona a la administración la dieta HFFD hipercalórica. De manera interesante, no se encontraron diferencias entre el peso del cerebro total entre ratas HFFD y controles, lo que muestra que los efectos de la HFFD sobre la pérdida de peso del hipocampo son específicos de esta zona, y sugiere que esta área presenta una vulnerabilidad particular a los componentes de la dieta o a alguna de las alteraciones metabólicas que ésta produce.

La HFFD promueve una disminución en la arborización dendrítica en neuronas hipocampales sin afectar el tamaño o número de somas neuronales

Para estudiar si la disminución en el peso del hipocampo en las ratas HFFD se debe a alteraciones estructurales del hipocampo, se realizó un estudio histológico de esta región mediante tinciones de Nissl. No se encontraron cambios evidentes en la forma, el tamaño o la apariencia de las capas neuronales de ninguna de las regiones del hipocampo en las ratas HFFD (Figura 11).

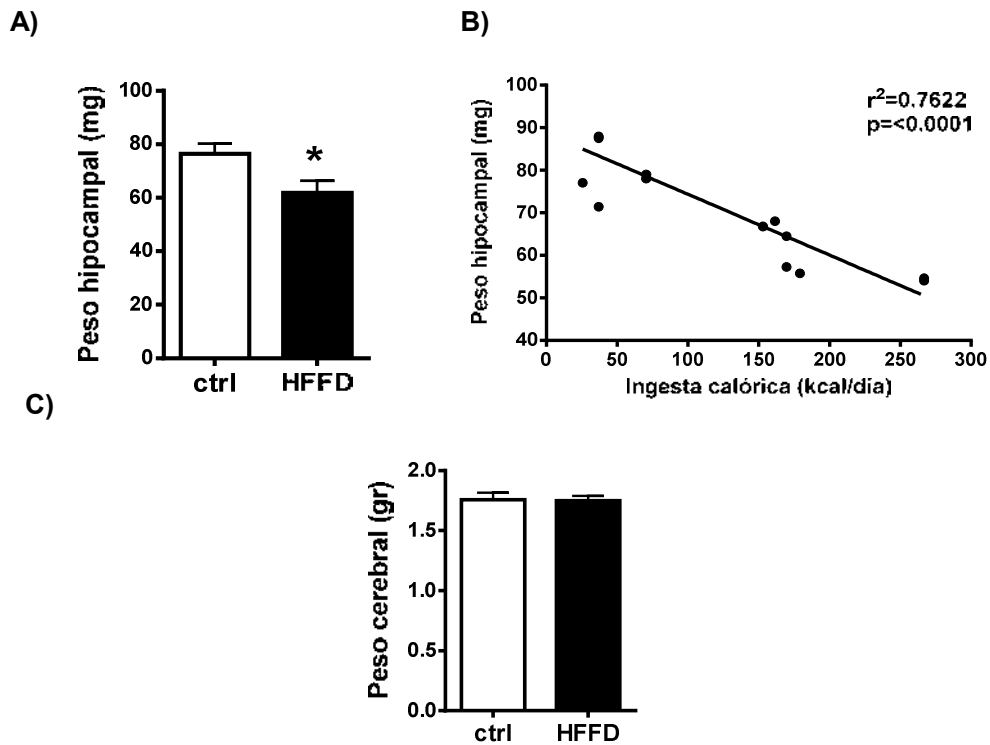


Figura 10. Análisis del peso del hipocampo. A) Determinaciones del peso húmedo de hipocampos disectados. B) Análisis de regresión lineal entre el peso del hipocampo y la ingesta calórica por animal. C) Determinaciones del peso húmedo de cerebros completos disectados. Se graficó el promedio y error estándar. n=10 ratas por grupo para A), n=5 ratas por grupo para C). *P< 0.05 vs. ctrl.

Ya que el colorante usado en la técnica de Nissl tiñe exclusivamente los somas neuronales se realizaron tinciones de Golgi, que permiten visualizar a la neurona completa, para realizar un análisis morfológico más detallado de las regiones neuronales que presentan mayor plasticidad: las dendritas y las espinas dendríticas. Primero, para estudiar la complejidad de la arborización dendrítica de las neuronas se realizaron análisis de Sholl. Este análisis consiste en trazar círculos concéntricos alrededor del soma neuronal hacia la periferia y posteriormente se grafica el número de intersecciones de las dendritas con cada círculo (Sholl, 1953). Se encontró que neuronas piramidales del área CA1 de ratas HFFD presentan una disminución en la arborización dendrítica de 100 μm a 300 μm a partir del soma de dendritas tanto apicales como basales (Figura 12).

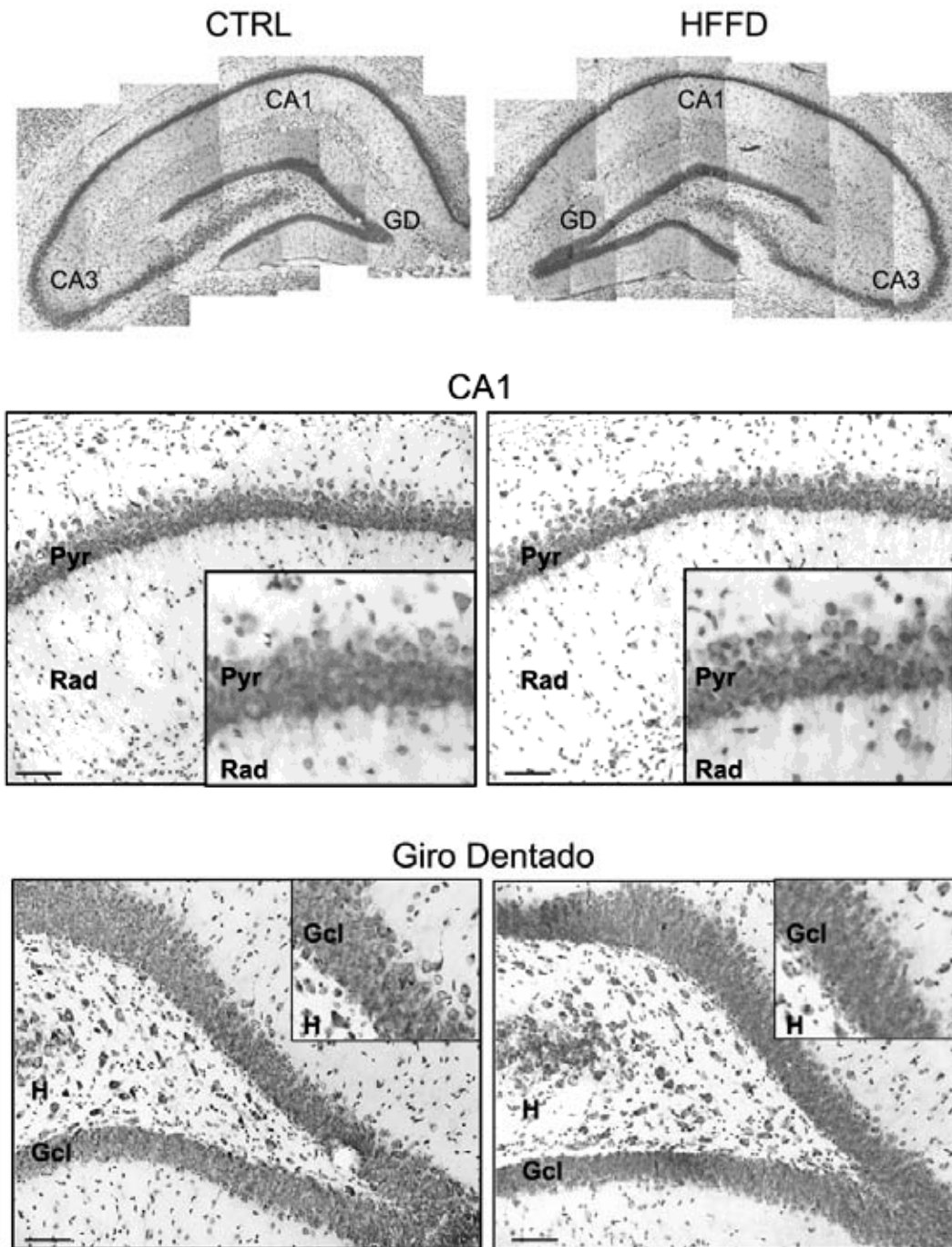


Figura 11. Análisis histológico del hipocampo. Tinción de Nissl del hipocampo. Panel superior: Reconstrucción del hipocampo completo de imágenes 10x. Panel medio: CA1. Panel inferior: Giro dentado. n=5 ratas por grupo. Barra de escala: 100 μ m. Recuadros correspondientes a 200 μ m. Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, capa granular; H, hilus.

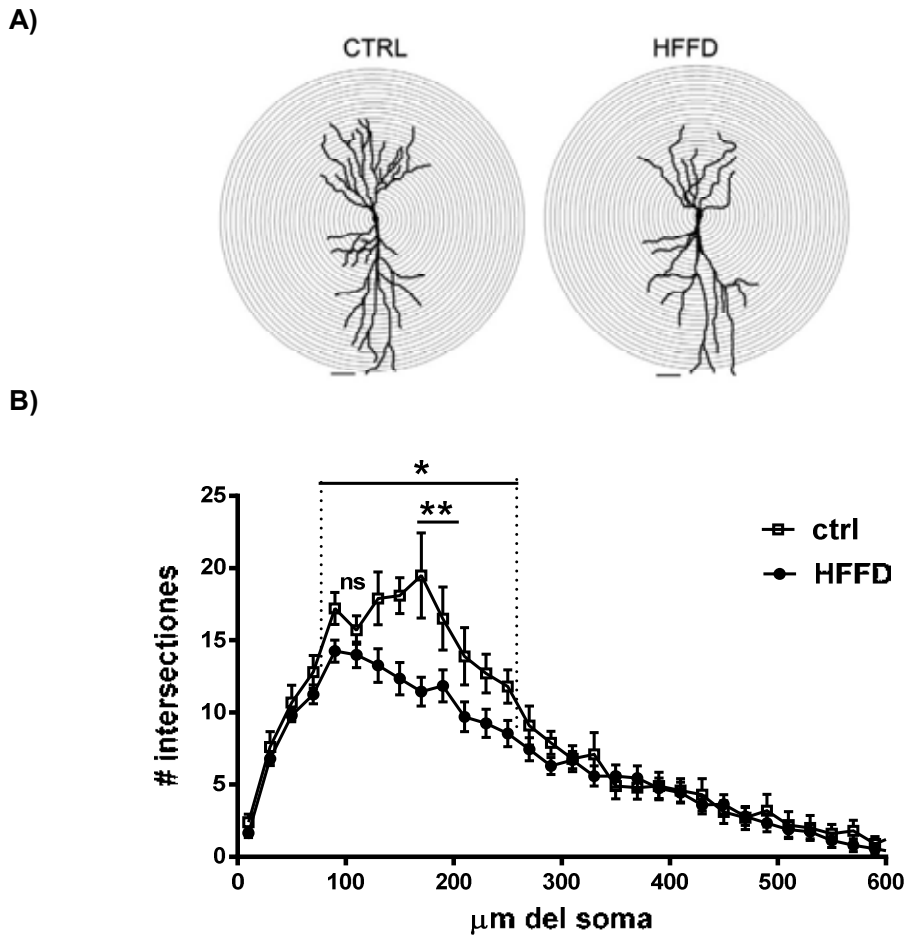


Figura 12. Análisis morfológico de neuronas piramidales del hipocampo. (A) Trazos representativos de neuronas control (ctrl) y HFFD teñidas con Golgi, así como la representación gráfica de los parámetros del análisis de Sholl realizado (círculos concéntricos: 20 μm). (B) Gráfica del análisis de Sholl en neuronas ctrl y HFFD. Se muestra promedio y error estándar. $n=3$ a 5 neuronas por rata; 4 ratas por grupo. Barra de escala: 100 μm . ns: no significativo, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs ctrl.

La disminución de la arborización dendrítica por HFFD se relaciona con una reducción en marcadores sinápticos en neuronas hipocampales

Posteriormente, se estudió el número de espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1 teñidas con Golgi y se encontró que las ratas HFFD presentan una disminución significativa en el número de espinas en dendritas apicales (81% $P < 0.001$) y basales (83%

P<0.05) con respecto a los controles (Figura 13). Adicionalmente, para confirmar que esta reducción en el número de espinas dendríticas en ratas HFFD se relaciona con una disminución en las sinapsis, determinamos el contenido total de la proteína presináptica sinaptofisina y observamos una disminución significativa comparada con las ratas controles (82% P<0.05) (Figura 13). Los datos anteriores muestran que la administración de HFFD produce cambios morfológicos importantes en las neuronas hipocampales de CA1. Estos cambios podrían subyacer a la pérdida de peso hipocampal observada en las ratas HFFD.

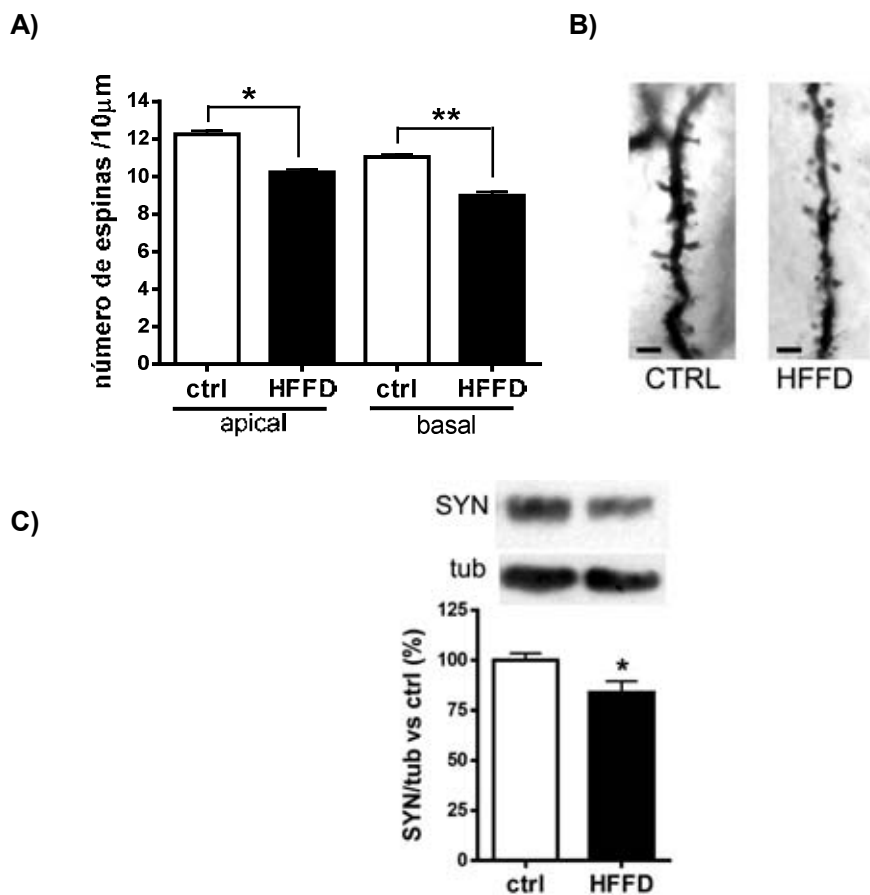


Figura 13. Estudio de marcadores sinápticos. (A) Conteo de espinas dendríticas en dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de CA1. (B) Dendritas representativas de neuronas control y HFFD teñidas con Golgi. (C) Western blot representativo y densitometría del contenido total de sinaptofisina. Se muestra promedio y error estándar. n=15-20 segmentos de 10 μm tomados de 6-12 neuronas por rata; 4 ratas por grupo para (A), n=8-10 ratas por grupo para (B). Barra de escala: 1 μm. *P<0.05, **P < 0.001 vs ctrl.

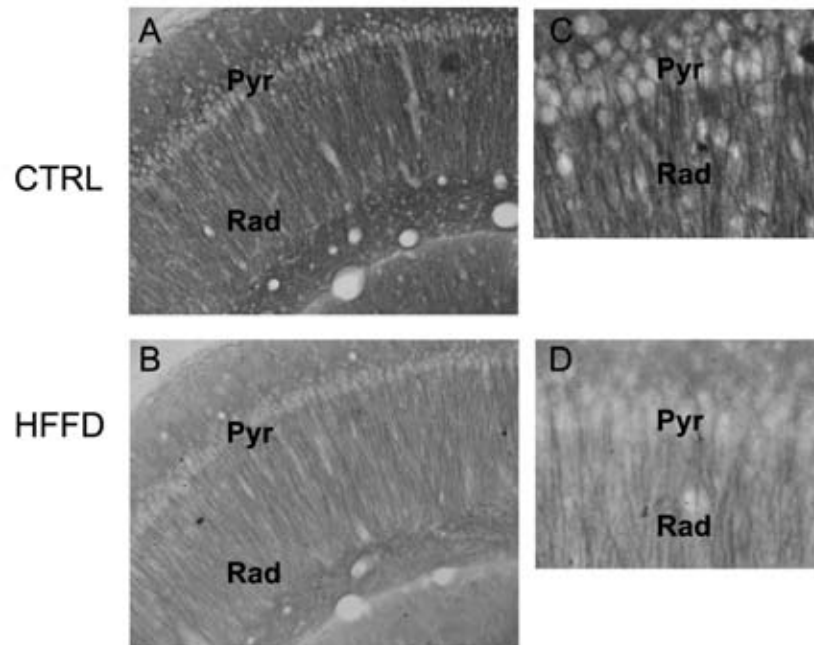
La disminución de arborización dendrítica y sináptica por HFFD en neuronas hipocampales se relacionan con alteraciones en las proteínas asociadas al citoesqueleto MAP-2 y tau

Debido a que se observaron reducciones significativas en las dendritas y espinas de las neuronas hipocampales de CA1 de ratas sometidas a HFFD, quisimos estudiar si existían cambios en proteínas asociadas al citoesqueleto que se relacionaran con estos fenómenos, ya que estas proteínas regulan la dinámica de remodelación dendrítica, sináptica y axonal. Una de las proteínas que brindan mayor estabilidad estructural a las dendritas es la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2). Por ello, se determinó la presencia de MAP-2 en el hipocampo mediante una inmunohistoquímica. Un posterior análisis cuantitativo reveló una reducción en la tinción de MAP-2 en las ratas HFFD tanto en CA1 (29.78%, $P < 0.001$) como en el giro dentado (18.75%, $P < 0.001$) con respecto a ratas control (Figura 14). Se observa además de esta disminución en las neuronas de las ratas HFFD, una redistribución de MAP-2 hacia el soma neuronal, así como un adelgazamiento en las dendritas. Dicho adelgazamiento también se observa en las tinciones de Golgi (Figura 13). Estos datos muestran que la reducción en la complejidad de la arborización dendrítica observada en las ratas HFFD se asocia a un adelgazamiento en las dendritas y a cambios en la distribución y presencia de MAP-2 en estas regiones neuronales.

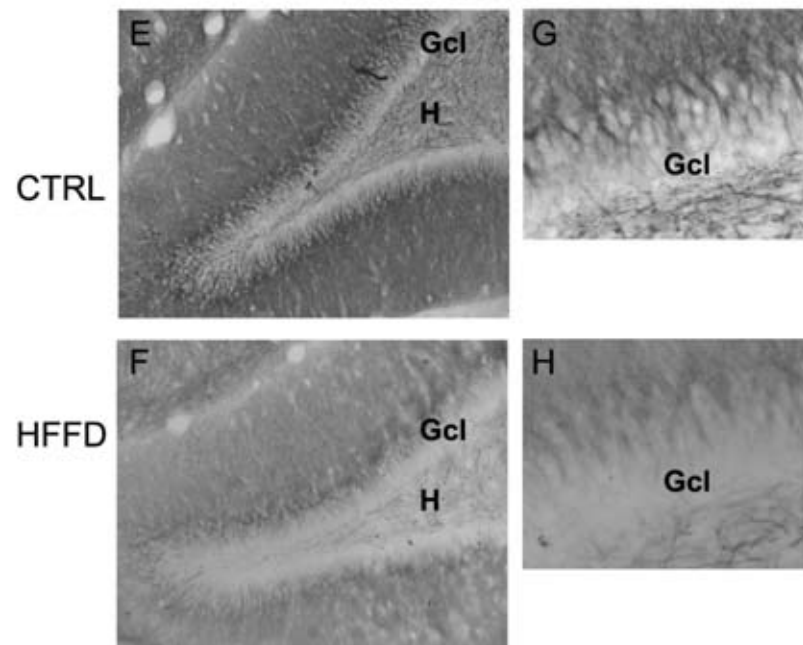
Además de MAP-2, decidimos estudiar otra proteína asociada a microtúbulos axonal, tau. La hiperfosforilación de tau en varios residuos se ha relacionado con el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer, demencias y algunas enfermedades neurodegenerativas llamadas tauopatías (REFs). Ya que tau puede ser fosforilada por GSK3 β , una cinasa que es regulada directamente por la vía de señalización de la insulina, decidimos estudiar si los residuos fosforilados por esta cinasa (S199/202) se encontraban alterados en el hipocampo de las ratas HFFD. Encontramos que la fosforilación de tau en el residuo S199/202 se incrementa de forma significativa en el hipocampo de las ratas HFFD (52%, $P < 0.001$) (Figura 14). Estos resultados demuestran que la administración de HFFD produce cambios importantes en proteínas asociadas a microtúbulos axonales y dendríticas en neuronas hipocampales.

A)

CA1



Giro Dentado



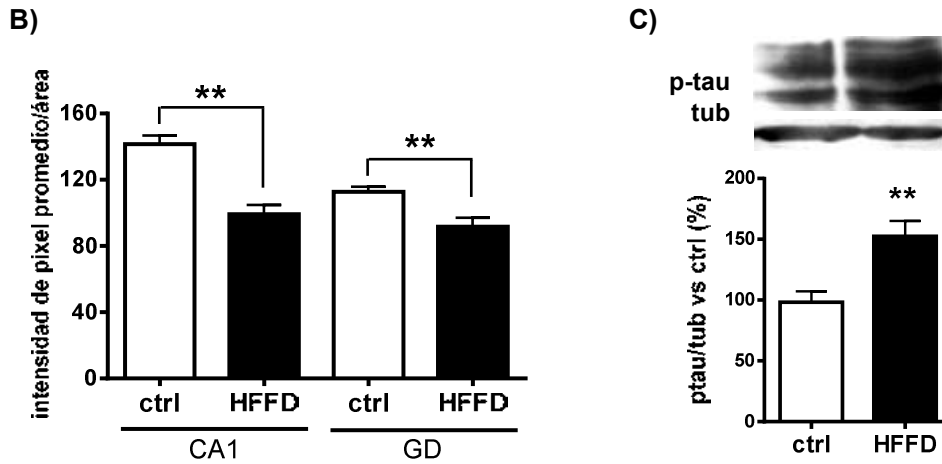


Figura 14. Análisis de proteínas asociadas al citoesqueleto neuronal. (A) Inmunohistoquímica de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) en CA1 (A-D) y giro dentado (GD) (E-H). (B) Densitometría de la intensidad de señal de MAP-2 en CA1 y en giro dentado (GD). (C) Western blot representativo y densitometría de ptau (S199/202). Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, capa granular; H, hilus. Se muestra promedio y error estándar. n=4 ratas por grupo para (A), n=8 ratas por grupo para (C). ** P < 0.001 vs ctrl.

La ingesta de HFFD promueve la activación de astrocitos y microglia hipocampales

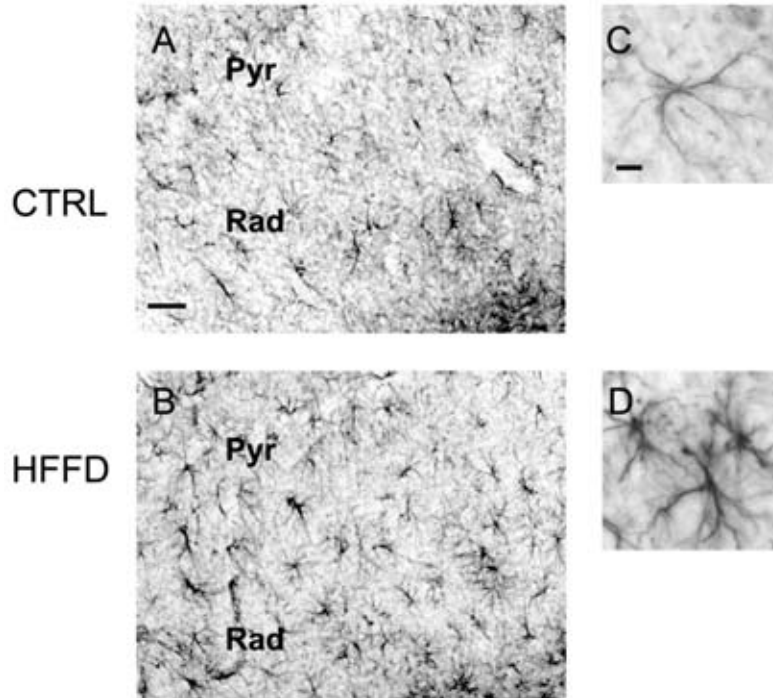
Debido a que las alteraciones metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico presentan inflamación de bajo grado (Canello et al. 2006; Lasselin et al, 2014), se ha estudiado el papel de agentes inflamatorios en el desarrollo de las comorbilidades de dichas alteraciones. Dentro de estos estudios se ha descrito que en modelos de obesidad murina por HFFD presentan inflamación y astrogliosis reactiva en el hipotálamo (Laura et al. 2013; Buckman et al. 2013). Por lo anterior, quisimos estudiar si el hipocampo es una zona susceptible a presentar inflamación debido a la exposición de HFFD a corto plazo. Para ello, estudiamos marcadores de activación gliales y microgliales. Primero estudiamos la activación de los astrocitos hipocampales mediante una inmunohistoquímica contra GFAP. Un análisis cuantitativo posterior reveló que las ratas HFFD presentan un incremento en el número de astrocitos reactivos (GFAP+) en CA1 (51% P<0.001) como en giro dentado (GD) (62.5% P<0.05) (Figura 15) contra ratas

controles. Adicionalmente, se encontró un incremento en el área de los astrocitos tanto en CA1 (77.7% $P < 0.001$) como en giro dentado (62.5%, $P < 0.05$) en las ratas HFFD, acompañado de cambios importantes en la morfología celular, sugerentes de activación astrocítica. De forma muy interesante, encontramos que los astrocitos que se encuentran en la capa subgranular del giro dentado extienden un mayor número de procesos astrocíticos hacia la capa neuronal granular en las ratas HFFD. Estos datos en conjunto muestran una activación astrocítica en respuesta a la dieta HFFD.

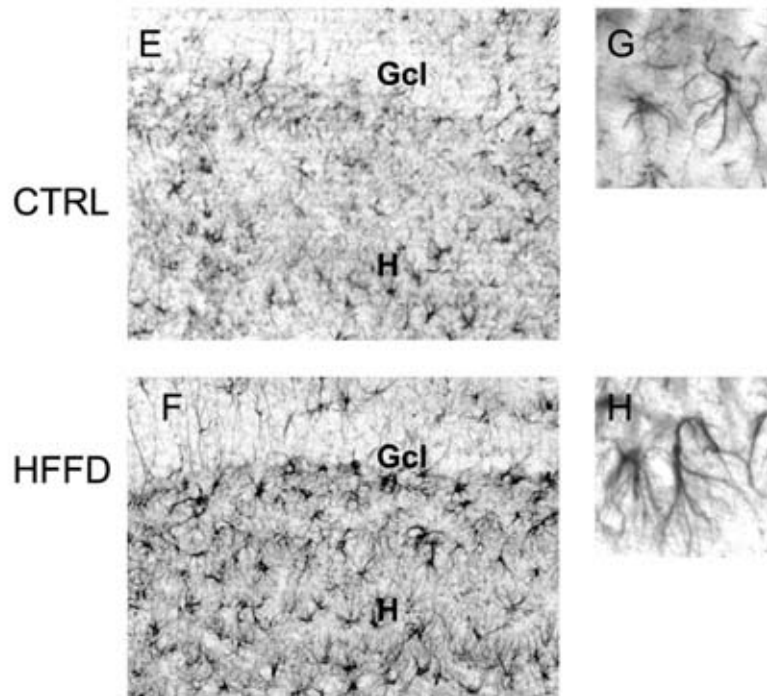
Posteriormente, para estudiar si esta activación se acompaña también de una respuesta de la microglia, determinamos por inmunohistoquímica contra Iba-1 la morfología de la microglia hipocampal. En el caso de los controles, la mayoría de las células Iba+ presentes en todas las zonas del hipocampo mostraron características de microglia en reposo, consistente en una morfología redonda y con varios procesos delgados, largos y ramificados (Figura 16). En el caso de las ratas HFFD, además se encontraron células Iba+ que presentan una morfología de microglia activa, con un soma alargado y ameboides, además de procesos mucho menos ramificados. La mayoría de las células con estas características fueron encontradas en la región de CA1, aunque también pudieron encontrarse algunas en giro dentado. Estos datos en conjunto sugieren que la administración a corto plazo de HFFD produce una respuesta inflamatoria a nivel hipocampal, la cual activa a glía y microglia de esta zona.

A)

CA1



Giro Dentado



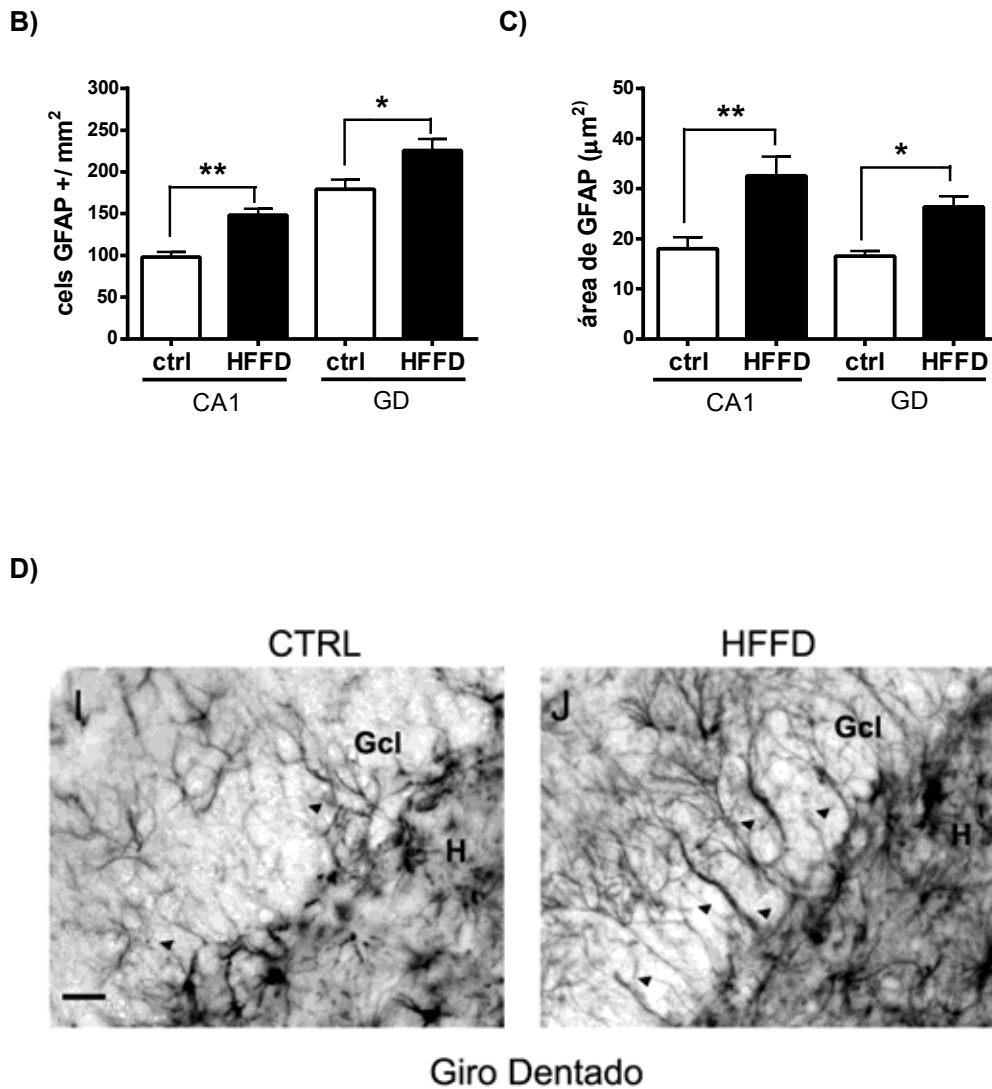


Figura 15. Análisis de marcadores de activación astrocítica. (A) Inmunohistoquímica contra la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) en CA1 (A–D) y en giro dentado (GD) (E–H). Magnificaciones de ambas áreas son mostradas en (C, D, G, H). (B) Gráfica del número de células GFAP+ por mm² en CA1 y giro dentado. (C) Gráfica del del área astrocítica total (GFAP+) en CA1 y giro dentado. (C) Procesos de células GFAP+ subgranulares hacia la capa granular del giro dentado (I, J). Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, capa granular; H, hilus. n=4 ratas por grupo. Barra de escala: 100 µm en (A): a, b, e, f, i, y j; 20 µm en (A): c, d, g, y h. Se muestra promedio y error estándar. *P < 0.05, ** P < 0.001 vs ctrl.

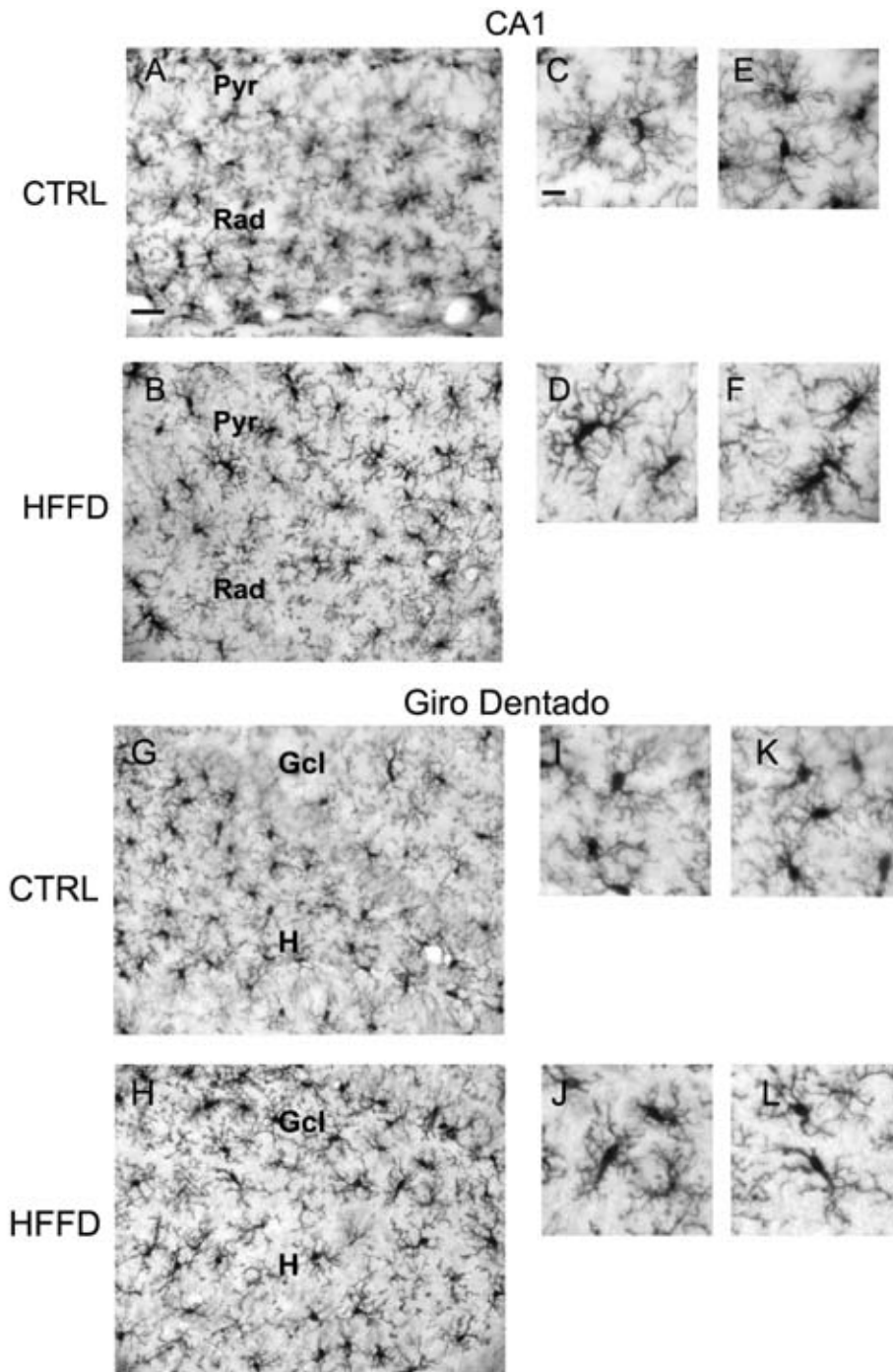


Figura 16. Análisis de marcadores de activación microglial. Inmunohistoquímica contra la proteína microglial Iba1 en CA1 (A–F) y en giro dentado (G–L). Magnificaciones de ambas áreas son mostradas en (C, D, E, F, I, K, J, L). Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, granular layer; H, hilus. n=4 ratas por grupo. Barra de escala: 100 μm en A, B, G, H; 20 μm en C, D, E, F, I, K, J, L.

ORIGINAL ARTICLES

Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus

Erika Calvo-Ochoa¹, Karina Hernández-Ortega¹, Patricia Ferrera¹, Sumiko Morimoto² and Clorinda Arias¹

Chronic consumption of high-fat-and-fructose diets (HFFD) is associated with the development of insulin resistance (InsRes) and obesity. Systemic insulin resistance resulting from long-term HFFD feeding has detrimental consequences on cognitive performance, neurogenesis, and long-term potentiation establishment, accompanied by neuronal alterations in the hippocampus. However, diet-induced hippocampal InsRes has not been reported. Therefore, we investigated whether short-term HFFD feeding produced hippocampal insulin signaling alterations associated with neuronal changes in the hippocampus. Rats were fed with a control diet or an HFFD consisting of 10% lard supplemented chow and 20% high-fructose syrup in the drinking water. Our results show that 7 days of HFFD feeding induce obesity and InsRes, associated with the following alterations in the hippocampus: (1) a decreased insulin signaling; (2) a decreased hippocampal weight; (3) a reduction in dendritic arborization in CA1 and microtubule-associated protein 2 (MAP-2) levels; (4) a decreased dendritic spine number in CA1 and synaptophysin content, along with an increase in tau phosphorylation; and finally, (5) an increase in reactive astrocyte associated with microglial changes. To our knowledge, this is the first report addressing hippocampal insulin signaling, as well as morphologic, structural, and functional modifications due to short-term HFFD feeding in the rat.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism advance online publication, 26 March 2014; doi:10.1038/jcbfm.2014.48

Keywords: high-fat-and-fructose diet; hippocampal dysfunction; hippocampal insulin signaling; insulin resistance; obesity; tau phosphorylation

INTRODUCTION

High intake of hypercaloric diets has increased alarmingly in the past years in western societies. The chronic consumption of diets rich in saturated fats and in processed sugars (high-fat-and-fructose diet, HFFD), particularly high fructose, is strongly associated with a variety of related metabolic diseases including obesity, systemic insulin resistance (InsRes), metabolic syndrome, and type-2 diabetes mellitus.^{1,2} These diseases have reached epidemic proportions and increased comorbid conditions such as elevated blood pressure, cardiovascular disease, and inflammation, which in turn lead to a reduced quality and expectancy of life.^{3–5} Obesity caused by hypercaloric diets may be associated with a diminished ability of cells to respond to the action of insulin, leading to InsRes and metabolic syndrome, characterized by hyperglycemia, dyslipidemia, and compensatory hyperinsulinemia.^{1,6}

Several epidemiologic studies have found that patients with obesity and InsRes have an increased risk for diverse cognitive impairments, including cognitive decline, mild cognitive impairment, and even Alzheimer's disease (AD).^{7–10} Studies performed in animal models of diet-induced obesity and InsRes such as long-term HFFD feeding show a deficient execution in memory and

learning tasks.^{11–16} These cognitive alterations were associated with functional and structural changes in the hippocampus, such as reduced number and complexity of dendritic spines in the CA1 subfield, altered establishment of long-term potentiation and long-term depression, and diminished dentate gyrus (DG) neurogenesis.^{11–13} The latter was correlated with decreased expression of brain derived neurotrophic factor, cyclic AMP-response element-binding protein and the synaptic proteins synapsin, and stargazin.¹¹

It has been extensively shown that insulin has a pivotal role in hippocampal neuronal function as a metabolic, growth, synaptic, and survival modulator.^{17–20} Additionally, insulin also has a role in enhancing memory and establishing long-term potentiation through several molecular mechanisms that include neurotransmitter release, expression and insertion of receptors at the postsynaptic membrane, and expression of postsynaptic proteins, mainly via the PI3-K/Akt signaling pathway.^{21–23} It has also been proposed that insulin can modify microtubule stabilization through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), a kinase that can phosphorylate the microtubule-associated protein (MAP) tau.^{24,25} Given these crucial roles of insulin in the hippocampus, it could be speculated that systemic insulin alterations

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México and

²Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, México. Correspondence: Dr C Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510 AP 70-228, México.

E-mail: carias@unam.mx

This work was supported by CONACyT 166482 and PAPIIT IN204212 grants to CA, and CONACyT 232879 Doctoral fellowship to EC-O. This work is part of E. Calvo-Ochoa's Doctoral Thesis, as requirement for graduation at 'Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas' (Doctoral on Biomedical Sciences program), of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Received 24 October 2013; revised 20 February 2014; accepted 24 February 2014

resulting from obesity and InsRes could result in hippocampal insulin alterations that underlie cognitive impairment. In this regard, it has been reported that long-term high-fat (not fructose) feeding in mice produced alterations in Akt and GSK3 β signaling in the hippocampus.²⁶ Since virtually all studies on hippocampal dysfunction due to HFFD administration have addressed the impact of long-term feeding, for more than 4 weeks, the present work aimed to investigate early biochemical and structural changes in the hippocampus after short-term consumption of HFFD. We found that obesity and InsRes caused by 7 days of HFFD intake were sufficient to alter insulin signaling in the hippocampus associated with decreased complexity of neurites, reduced synaptic markers, modifications of MAPs, and increased number of reactive astrocytes and microglia. These findings shed light on the early molecular and cellular changes in response to reduced hippocampal insulin sensitivity associated with excessive lipid and fructose intake.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals and salts were purchased from J.T. Baker Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA), unless otherwise stated.

Animals and Diets

Animals were handled in accordance with local government rules and the Society for Neuroscience Guide for the Care and Use of Laboratory Animals with approval of the Animal Care Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of subjects used. We used 48 male Sprague Dawley rats weighing 250 to 270 g (Harlan Laboratories, Facultad de Química, UNAM, Mexico). Animals were individually housed under standard conditions (12 hours light/dark cycles, 22°C). Rats were divided into two groups and fed for 7 days as follows: The control (ctrl) group ($n=20$) was fed a standard rodent chow (3 kcal/g; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) and bidistilled water (0 kcal/g), and the experimental group ($n=22$) was fed a high-fat diet consisting of standard rodent chow supplemented with 10% lard (5.4 kcal/g; Bio-Serv, Frenchtown, NJ, USA), and 20% high-fructose corn syrup in the bidistilled water (0.83 kcal/ml, commercially available corn syrup). All rats had *ad libitum* access to their diets and drinking water. Food and water intake were recorded. Food was removed the morning of the studies. After a 5-hour fast, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg) and killed. Rats receiving an insulin bolus ($n=8$ per group) were anesthetized and given an intraperitoneal injection of insulin (5 U/kg; Sigma, St Louis, MO, USA) and decapitated after 15 minutes.

Serum Glucose, Insulin, and Leptin Determination

Trunk blood was collected from animals after they were killed. Serum was collected by centrifugation and stored at -20°C . For glucose concentration determinations, a OneTouch Ultra glucose monitor was used (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, USA). Insulin and leptin concentrations were performed in duplicate by solid-phase ¹²⁵I radioimmunoassay (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) in serum samples. The sensitivity of the assays was 0.04 ng/mL to insulin and 0.08 ng/mL to leptin. The intraassay and interassay coefficients of variation were 4% and 6%, and 5.1% and 7%, respectively.

Western Blotting

Animals ($n=16$ control, $n=16$ HFFD) were anesthetized as described and decapitated. We rapidly dissected hippocampus from whole brains that were immediately frozen and stored at -20°C . Then, tissues were homogenized, lysed for 20 minutes and then sonicated in 1-second pulses for 20 times at 4°C in RIPA lysis buffer (50 mmol/L HEPES, pH 7.7; 100 mmol/L sodium chloride; 2 mmol/L PMSF; 1% NP-40; complete inhibitor cocktail from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) and phosphatase inhibitor cocktail from Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were centrifuged at 20,817 g for 15 minutes at 4°C and supernatants were collected. Protein concentration was determined using a BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Lysates were boiled in Laemmli buffer and fractionated in SDS-PAGE 10% acrylamide gel. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire,

England) under standard conditions. We blocked membranes with 5% nonfat-milk-TBS-T and incubated them with one of the following primary antibodies at 4°C overnight in 3% BSA (bovine serum albumin)-TBS-T: anti-p1R Y1146 (1:1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-pIRS-1 Y608 (1:250; BioSource, Carlsbad, CA, USA); anti-pAkt S473 (1:1,000; Cell Signaling Technology); anti-pS6K T389 (1:500; Cell Signaling Technology); anti-pTau S199/S202 (1:2,000; Chemicon, Temecula, CA, USA); anti-SYP (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) anti-tubulin (1:30,000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Next, we incubated membranes with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 hours at room temperature in 5% nonfat-milk-TBST-T (anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz Biotechnology) and membranes were revealed using a chemoluminescent substrate ECL (Millipore) on Kodak X-Omat film. Densitometric analysis of the bands obtained was performed using Photoshop. To normalize the data, we divided the values obtained for each band into their respective tubulin loading control and obtained a ratio. This value was then converted to percent of control for each experiment.

Histology and Immunohistochemistry

Animals ($n=8$ control, $n=8$ HFFD) were perfused transcardially with phosphate-buffered saline (PBS) 1 \times and 4% paraformaldehyde as a fixative (Sigma). Brains were then removed and stored at 4°C in fixative. Afterwards, brains were successively transferred to 20% and 30% sucrose solutions for 24 hours each, and then sectioned coronally throughout the entire hippocampus into 30 μm thick sections using a cryostat at -20°C . Coronal sections were treated for immunohistochemistry or were stained with cresyl violet or Golgi staining. For immunohistochemistry, free-floating sections were incubated at room temperature for 30 minutes in PBS containing 0.25% Triton X-100 and 0.3% H₂O₂ and left for 2 hours at 4°C in PBS/5% BSA solution. Slices were then immersed overnight at 4°C in a PBS/5% BSA solution containing one of the following antibodies: anti-GFAP (1:500; Dako, Glostrup, Denmark), anti-Iba1 (1:250; Dako), anti-MAP-2 (1:500; Millipore). After this period, the brain slices were washed three times with PBS, each for 5 minutes, and incubated with the secondary antibody, biotinylated mouse IgG (1:500; Vector, Burlingame, CA, USA) for 2 hours at room temperature. Finally, the slices were processed with the ABC-biotin-avidin-peroxidase kit (Vector) and developed with diaminobenzidine tetrahydrochloride as a substrate for peroxidase reaction. For negative controls, primary antibodies were omitted from the procedure. All images were captured with a digital camera attached to a Zeiss, Axioskop 40 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Microtubule-Associated Protein 2 Densitometry and GFAP Quantification

Four animals per group were used for immunostaining. For MAP-2 densitometry, 3 to 4 100 μm \times 100 μm sections were selected from $\times 20$ magnification images of different sections of the stratum pyramidale of CA1 and the granular cell layer of the DG. The mean pixel intensity was automatically calculated using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/>). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunopositive cells were hand recorded from $\times 20$ magnification images of four different sections of the stratum radiatum of CA1 and the hilus of DG per animal. Cells were counted when complete processes and nuclei were clearly observed, and expressed as the number of cells per mm². For calculating GFAP area, ImageJ was used. $\times 40$ magnification images were used, and only complete astrocytes were selected. The area of each cell was automatically calculated.

Golgi Staining, Sholl Analysis, and Dendritic Spine Count

Four animals per group were used for Golgi stainings. We used the FD Rapid Golgi Stain kit with the manufacturers' instructions (FD NeuroTechnologies, Columbia, MD, USA). Stained brains were sliced using a Vibratome (VT1000S; Leica, Wetzlar, Germany) at a thickness of 150 μm . For Sholl analysis, traces of CA1 neurons obtained at magnification $\times 20$ were loaded into ImageJ and then the Sholl Analysis plug-in was used for automatic analysis (<http://labs.biology.ucsd.edu/ghosh/software/>). For dendritic spine count, $\times 40$ magnification images of CA1 neurons were used, and spine was counted in segments of 10 μm of the dendrite manually. Only secondary and tertiary dendrites were used for the analysis, and no more than three 10 μm segments of the same dendrite were counted. Both Sholl Analysis and spine counting were performed in a blind manner.

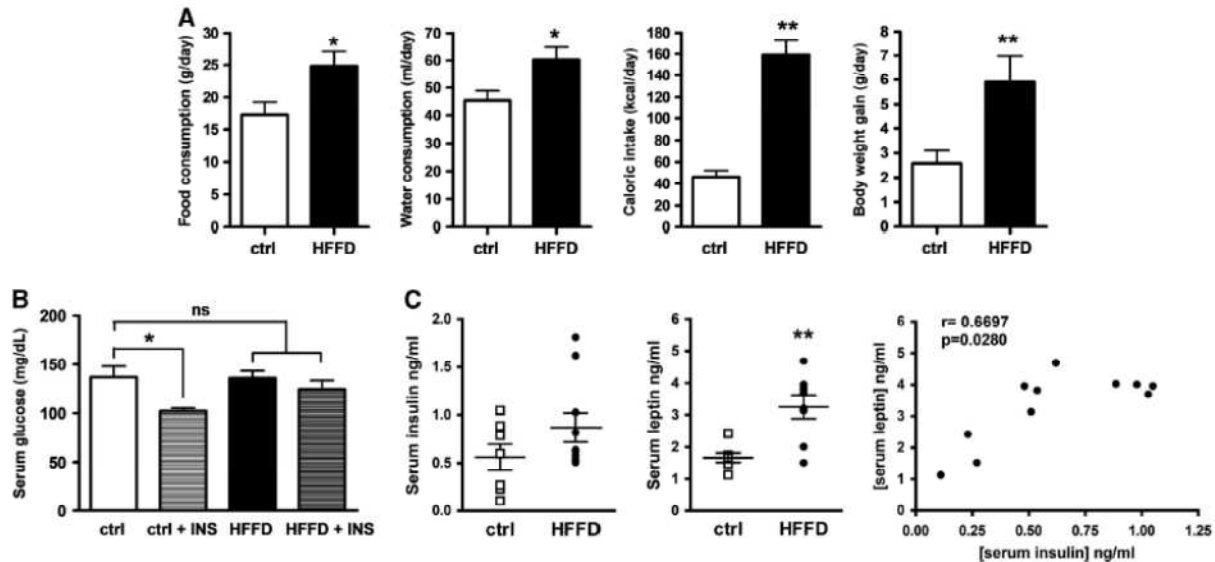


Figure 1. Obesity and insulin resistance parameters. (A) Determination of: food consumption, water consumption, caloric intake, and weight gain in ctrl and high-fat-and-fructose diet (HFFD) rats. (B) Serum glucose concentration in fasted animals in basal state and after 15 minutes of an intraperitoneal insulin bolus administration of 5 U/kg (+INS). (C) Serum insulin and leptin levels in fasted animals; Spearman rank test showing a positive correlation between the concentration of insulin and leptin serum levels. Mean and s.e.m. are shown. $n = 10$ to 12 rats per group for (A), $n = 6$ to 10 rats per group for (B and C). n.s.: not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. ctrl.

Statistical Analysis

Results represent the mean \pm s.e.m. Comparisons among groups were made using a nonpaired Student's *t*-test. Correlation of hippocampal weight with caloric intake per rat was assessed by linear regression analysis, and the correlation of insulin and leptin levels was evaluated by the Spearman Rank test (*r*). A $P < 0.05$ was considered as significant. We used GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) for graphs and statistical analysis.

RESULTS

Short-Term High-Fat-And-Fructose Diet Feeding Induces Obesity and Systemic Insulin Resistance

Previous studies have shown that rats fed with HFFD for 3 days show hepatic InsRes, while 7 days of HFFD feeding are required for InsRes to be systemic.^{2,27} To assess the metabolic state of the rats used in this study, we examined some nutritional, metabolic, and hormonal parameters. We found that ingestion of HFFD for 7 days produces hyperphagia, obesity, and InsRes (Figure 1). Further, HFFD-fed rats consumed significantly more chow (43.8%, $P < 0.05$) and water (33%, $P < 0.05$) than controls and thus had an increased caloric intake (254%, $P < 0.001$), leading this experimental group to gain more weight (132%, $P < 0.001$) (Figure 1A). We also investigated whether systemic insulin sensitivity was diminished in HFFD-fed animals. Fasting serum glucose levels were evaluated at basal state and after 15 minutes of the administration of an intraperitoneal insulin bolus (5 U/kg) (Figure 1B). While basal glucose levels were not different in both groups, insulin injection significantly reduced blood glucose levels in control rats (24.7%, $P < 0.05$) but not in HFFD rats (9%, n.s.), indicating an impairment in systemic insulin sensitivity in HFFD-fed rats. In agreement with this, we found that serum insulin levels were increased in HFFD rats (55.3%, n.s.). Additionally, we measured leptin levels since it has been reported by some groups that InsRes is accompanied by leptin resistance, and that the ratio of both hormones can be used as a parameter for measuring metabolic alterations in humans and rodents.²⁸ We found a significant increase in leptin levels in the HFFD rats as compared with controls (94.5%, $P < 0.001$) as well as a positive correlation between the two hormones levels ($r = 0.6697$, $P = 0.0280$) (Figure 1C). These data indicate that HFFD-fed rats develop systemic InsRes and elevated levels of leptin, which has also been associated with the development of obesity and InsRes.

High-Fat-And-Fructose Diet Downregulates Insulin Signaling in the Hippocampus

High-Fat-And-Fructose Diet Downregulates Insulin Signaling in the Hippocampus

To investigate whether HFFD feeding modulates hippocampal insulin signaling, we examined the phosphorylation state of insulin receptor (IR^{Y1146}), insulin receptor substrate-1 ($IRS-1^{Y608}$), and protein kinase B (Akt^{S473}). There was a marked decrease in IRS-1 and Akt phosphorylation in rats fed with HFFD for 7 days compared with control rats (51%, $P < 0.001$ and 25%, $P < 0.05$, respectively) (Figures 2B and 2C), whereas no significant change in IR phosphorylation was found (3%, n.s.) (Figure 2A). These findings collectively indicate that 7 days of HFFD feeding are sufficient to modify hippocampal insulin signaling. Earlier experiments in rats have shown that HFFD feeding activates the mTOR/S6K pathway in muscle, liver, and mediobasal hypothalamus.^{29,30} Therefore, we analyzed whether HFFD also induces the activation of S6K in the hippocampus. As shown in Figure 2D, we found an enhanced S6K phosphorylation of threonine 389 after 7 days of HFFD feeding (71.9%, $P < 0.001$).

High-Fat-And-Fructose Diet Decreases Hippocampal Weight, Dendritic Branching in CA1 and Induces Cytoskeletal Protein Modifications

To evaluate whether HFFD-mediated blunting of insulin signaling in the hippocampus was accompanied by morphologic alterations, we examined different parameters of hippocampal integrity. As shown in Figure 3A, a significant reduced hippocampal wet weight was observed in the HFFD group (19.5%, $P < 0.05$) as compared with control animals (Figure 3A). This decrease in hippocampal weight positively correlated with the caloric intake of each rat ($r^2 = 0.7622$) (Figure 3A), but was not associated with morphologic changes assessed by Nissl staining (Figure 3B). However, a detailed histologic analysis by Golgi impregnation and a Sholl analysis revealed a reduction in the dendritic arbor

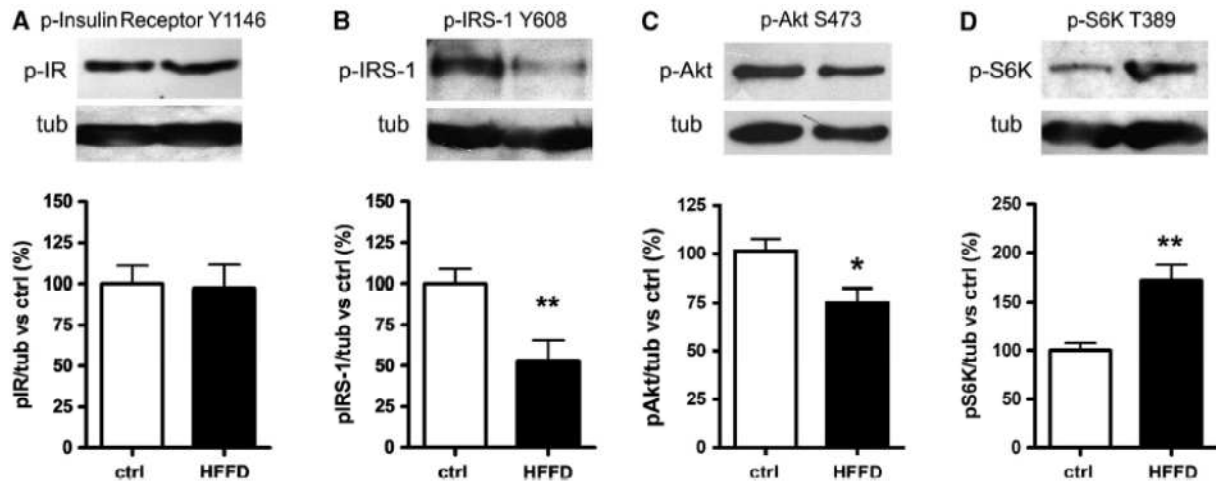


Figure 2. Hippocampal insulin signaling assessment. Western blot of insulin signaling proteins: (A) phospho-Y1146-insulin receptor (IR), (B) phospho-Y608-insulin receptor substrate-1 (IRS-1), (C) phospho-S473-Akt and (D) phospho-T389-S6K. Representative western blots and densitometric analysis. Mean and s.e.m. are shown from 6 to 10 rats per group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. ctrl.

complexity of the pyramidal CA1 neurons from HFFD-fed animals (Figure 3C). This reduced dendritic branching was observed in both basal and apical dendrites. Furthermore, MAP-2, a protein related with changes in structural stability in dendrites, was significantly decreased in HFFD rats as compared with controls in both CA1 (29.78%, $P < 0.001$) and DG (18.75%, $P < 0.001$) (Figures 3D and 3E). In addition, we found the axonal MAP tau was significantly phosphorylated in a reported GSK3 β site, S199/202 (52%, $P < 0.001$), in HFFD-fed rats (Figure 3F).

High-Fat-And-Fructose Diet Feeding Is Associated with Reduced Synaptic Markers

Since it was found that CA1 neurons of HFFD rats presented a reduction in the dendritic arbor complexity, we wanted to analyze whether this reduction was accompanied by a decrease in presynaptic and postsynaptic elements. To this end, we counted the number of dendritic spines in Golgi-stained CA1 neurons. Quantitative analysis revealed a significant decrease in spines on both apical (81%, $P < 0.001$) and basal (83%, $P < 0.05$) dendrites in the HFFD rats (Figure 4A). Additionally, we found a significant reduction in the presynaptic protein synaptophysin (82%, $P < 0.05$) (Figure 4B).

High-Fat-And-Fructose Diet Causes Glial Activation

Given that inflammation and reactive astrogliosis have been found in the hypothalamus in response to obesity,³¹ we wanted to evaluate the impact of a short-term exposure to HFFD feeding in astrocytic activation in the hippocampus using GFAP immunohistochemistry to evaluate the number and morphology of astrocytes. Diet-induced obesity was associated with a significant increase in GFAP + cell number in CA1 (51%, $P < 0.001$) and DG (25.69%, $P < 0.05$) (Figures 5A and B), accompanied by a significant increase in GFAP area in both CA1 (77.7% $P < 0.001$) and DG (62.5%, $P < 0.05$) (Figure 5B). The latter was associated with a change in astrocyte morphology from rounded to stellate shape (Figure 5A). We also found an increase in astrocytic processes extending to the neuronal layers of the DG in the HFFD rats (Figure 5B). Overall, these data suggest a reactive astrocytic response of the hippocampus. Microglial changes were analyzed with Iba 1 staining. The majority of cells showed the characteristic resting microglia morphology consisting in a rod-shaped cell body with many thin processes along all areas of the hippocampus and similarly in both groups of

rats. However, it was also observed the presence of few cells that showed the morphology of activated microglia with elongated cell somata and fewer branches mainly located in the CA1 region from HFFD rats (Figure 5C).

DISCUSSION

The goal of this work was to find biochemical and structural changes in the hippocampus of short-term HFFD-fed rats, since there is no information about the early modifications that occur during acute intake of HFFD in this particular highly plastic region. In this work, we show that HFFD feeding for 7 days reduced hippocampal insulin signaling accompanied by several cytoskeletal modifications, dendritic and synaptic reductions, and astroglial activation.

It is important to mention that the HFFD used in this work substantially reflects hypercaloric western diets consisting of high saturated fats and cholesterol as well as beverages containing high fructose syrup, and therefore is one of the most complete models of metabolic alterations due to hypercaloric diets.

Although it has been thoroughly studied that 7 days of overfeeding rapidly induced hepatic and then systemic InsRes,² to our knowledge, this is the first report that shows the impact of an acute HFFD on hippocampal insulin signaling associated with rapid structural changes in this region.

The results of this study show that 7 days of HFFD feeding were effective for inducing systemic InsRes as determined by the presence of moderately higher circulating insulin and leptin levels and a diminished insulin-dependent reduction in blood glucose. In the hippocampus, we did not find changes in the phosphorylation state of the IR, suggesting that they respond to basal insulin levels in a similar way in both HFFD and control rats. In contrast, IRS-1^{Y608} phosphorylation was importantly diminished in the hippocampus of the HFFD group, although insulin receptor is apparently functional and phosphorylated. Phosphorylation of serine residues of IRS-1 mediated by kinases such as S6K, JNK and PKC, among others, prevents IRS-1 from recognizing the phosphorylated insulin receptor, and therefore gives rise to InsRes in HFFD-fed animals.^{27,29,30} In line with this, we found an increase in S6K kinase activation, which might in turn phosphorylate IRS-1 in serine residues and therefore blunt insulin signaling in the HFFD-fed rats. mTOR/S6K signaling can be activated by insulin, some growth factors and nutrients. Since insulin signaling is downregulated in our model, we believe that S6K

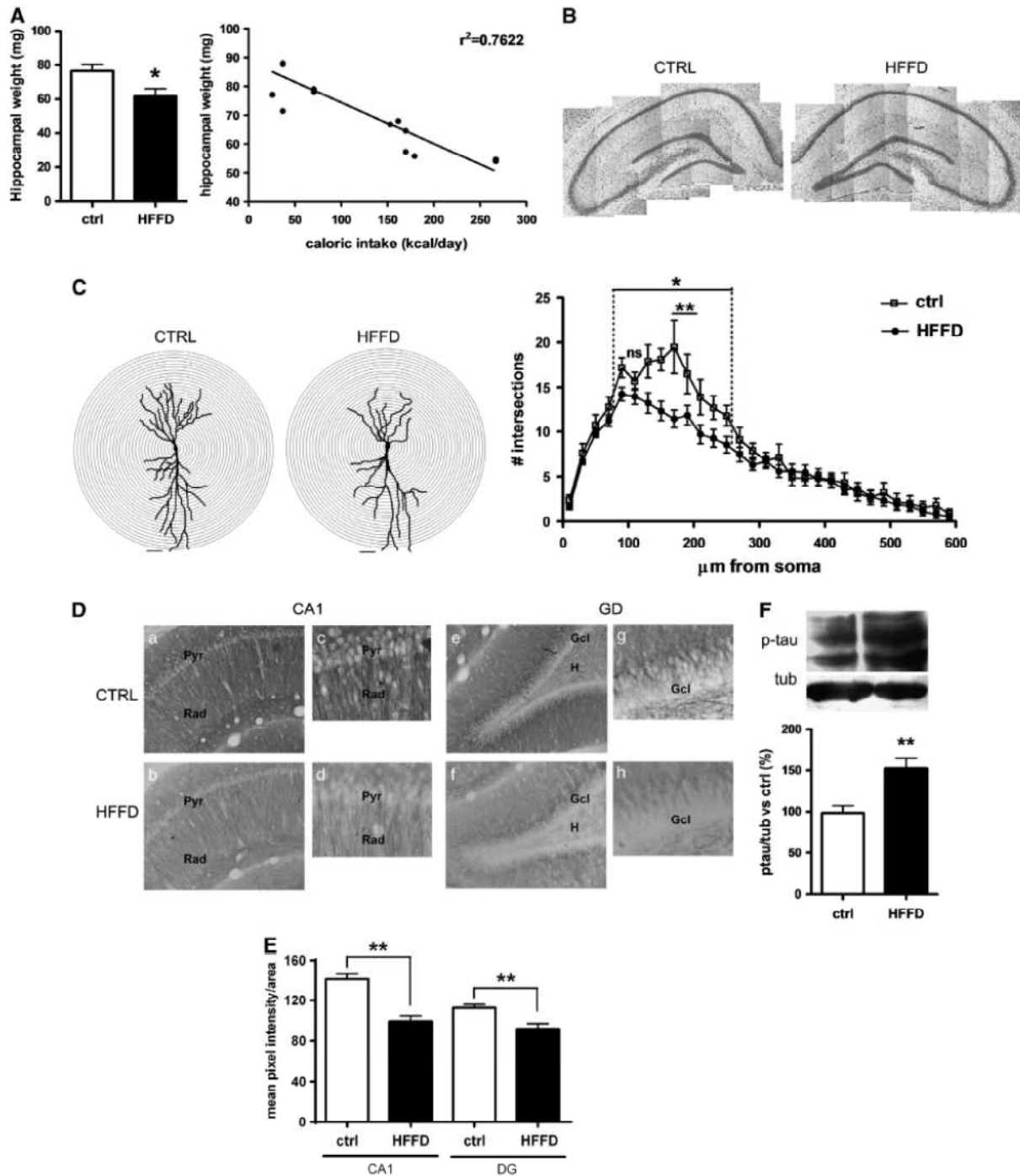


Figure 3. Immunohistochemical and morphologic analysis of the hippocampus. **(A)** Wet weight measurements of dissected hippocampus and linear regression analysis showing a negative linear correlation between hippocampus weight and caloric intake. **(B)** Nissl staining in whole hippocampus reconstructions from $\times 10$ images. **(C)** Sholl analysis in Golgi-stained CA1 neurons. Representative traces of ctrl and high-fat-and-fructose diet (HFFD) neurons along graphic description of Sholl analysis parameters (concentric circles: $20\ \mu\text{m}$). **(D)** Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) immunohistochemistry in CA1 **(A–D)** and dentate gyrus (DG) **(E–H)**. **(E)** MAP-2 densitometry. **(F)** Representative western blot of phospho-S199/S202-tau. Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, granular layer; H, hilus. Mean and s.e.m. are shown. n.s.: not significant $n = 10$ rats per group for **(A, E)**, $n = 4$ rats per group for **(B, D)**, $n = 3$ to 5 neurons per rat; 4 rats per group for **(C)**. Scale bar = $100\ \mu\text{m}$ in **(C, D)**; a, b, e, and f; $20\ \mu\text{m}$ in **(D)**; c, d, g, and h. * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$ vs. ctrl.

activation is caused by signaling pathways activated by the increase in saturated fatty acids, as has been found in the hypothalamus and the amygdala.^{29,30} Another interesting finding was a significant

decrease in Akt^{Ser473} phosphorylation, which is indicative that hippocampal insulin signaling can be compromised at different levels after consumption of an HFFD.

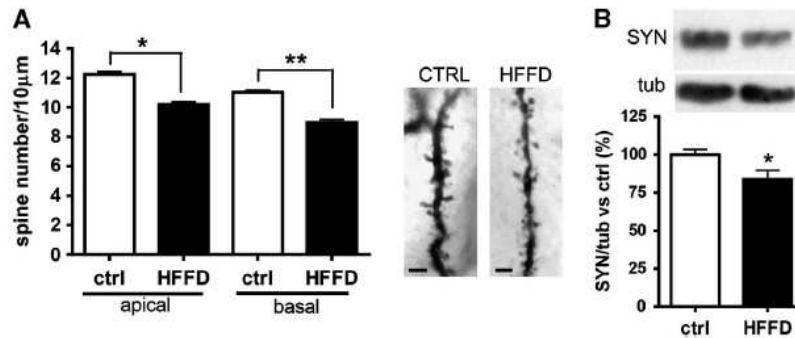


Figure 4. Evaluation of synaptic markers. (A) Dendritic spine count on basal and apical dendrites of CA1 neurons. Representative Golgi-stained dendrites of ctrl and high-fat-and-fructose diet (HFFD) neurons. (B) Representative western blot and densitometry of synaptophysin. Mean and s.e.m. are shown. $n = 15$ to 20 $10\ \mu\text{m}$ segments taken from 6 to 12 neurons per rat; 4 rats per group for (A), $n = 8$ to 10 rats per group for (B). Scale bar: $1\ \mu\text{m}$ in (A). * $P < 0.05$ and ** $P > 0.001$ vs. ctrl.

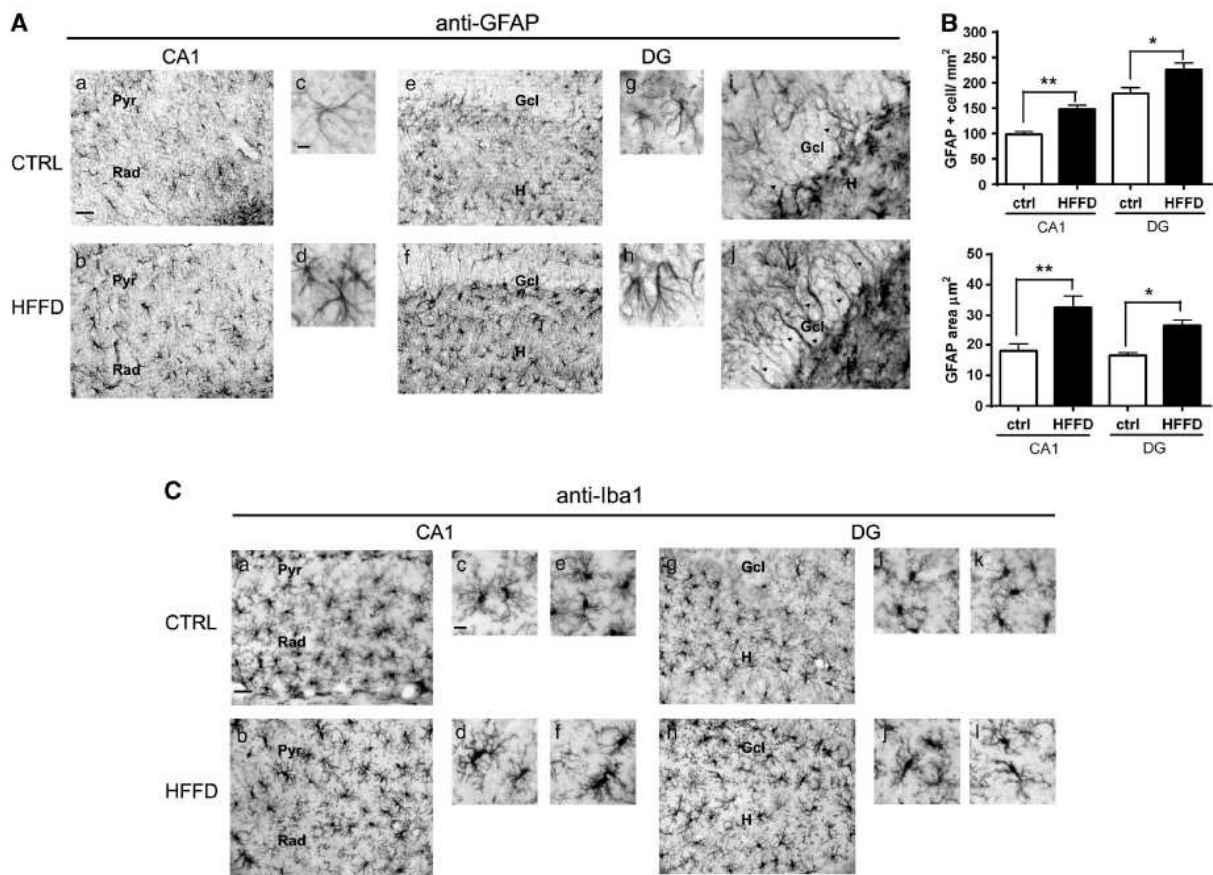


Figure 5. Changes in hippocampal astrocytes and microglia. (A) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in CA1 (A–D) and dentate gyrus (DG) (E–J). (I and J) The detail of GFAP+ processes onto the granular layer of the DG is shown. (B) Number of GFAP+ cells per mm^2 , and total astrocytic area (GFAP+) in CA1 and DG. (C) Iba1 immunohistochemistry in CA1 (A–F) and DG (G–L). Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum; Gcl, granular layer; H, hilus. Mean and s.e.m. are shown. $n = 4$ rats per group. Scale bar: $100\ \mu\text{m}$ in (A); a, b, e, f, i, and j; in (C); a, b, g, and h; $20\ \mu\text{m}$ in (A); c, d, g, and h; in (C) c, d, e, f, i, j, k, and l. * $P < 0.05$, ** $P > 0.001$ vs. ctrl.

The hippocampus is a highly plastic structure and particularly sensitive to environmental and nutritional stressors. Thus, we were interested in studying neuronal alterations that could be associated with the hippocampal blunted insulin signaling we observed. In line with this, we analyzed several structural changes within the hippocampus. Surprisingly, we found a slight reduction

of the hippocampal wet weight in HFFD-fed rats that linearly correlates with caloric intake. It is noteworthy that total brain weight was not different among groups (data not shown). In a previous study, a reduction of hippocampal volume in patients with type-2 diabetes mellitus was reported, while total brain weight remains unaffected, suggesting that the hippocampus

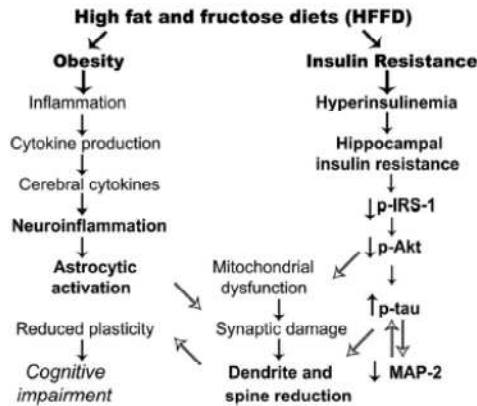


Figure 6. Proposed integrative model of systemic and hippocampal alterations associated with insulin resistance and obesity caused by short-term high-fat and fructose feeding. Parameters/mechanisms assessed in this work are written in bold font, whereas known mechanisms reported in the literature are shown in plain font. MAP-2, microtubule-associated protein 2; IRS-1, insulin receptor substrate-1.

presents a particular sensitivity to metabolic diseases.³² The decrease that we observed in hippocampal weight was not accompanied by evident changes in the area or the general appearance of the hippocampal layers, as showed by the conventional Nissl staining. At this point, it is unclear whether all the hippocampal morphologic changes due to HFFD that we observed are the sole responsible for the reduction of weight in the hippocampus, or other mechanisms such as tissue dehydration, a modification in the composition of the membrane lipids and cholesterol levels, etc. could also be responsible.

A more detailed histologic examination revealed a significant decrease in the dendritic complexity of CA1 neurons, associated with a significant reduction in MAP-2 immunoreactivity in dendrites on the whole hippocampus of HFFD rats. We also found a reduction in dendritic spine density of neurons in CA1 and a significant decrease in the presynaptic protein synaptophysin. MAP-2 is a microtubule-associated protein that has been shown to be decreased in some models of neurodegeneration and AD.^{33,34} In particular, it was reported that rats fed with a high-fat diet (soybean oil and cholesterol supplemented, no fructose) for 8 weeks present a diminished staining of MAP-2 in the hippocampus, and that this reduction is correlated with memory errors.¹⁶ Microtubule-associated protein 2 modifies and controls microtubule assembly and spacing within dendrites. Thus, a fine regulation of MAP-2 dynamics can alter hippocampal plasticity. The downregulation of MAP-2 immunoreactivity found in HFFD-fed rats associated with reduced hippocampal insulin signaling may involve an altered protein localization, increased phosphorylation, and/or degradation and diminished gene expression. The last possibilities can be excluded because we did not find changes in total MAP-2 content in the HFFD group (data not shown). It is remarkable that such dramatic changes in neuronal morphology are found with just 7 days of HFFD feeding. Further studies will be required to assess whether these morphologic changes are correlated with synaptic or neuronal dysfunction. Impairment of dendritic spine density and MAP-2 reduction were accompanied by an increased phosphorylation of tau in the S199/202 residue, a reported GSK3 β phosphorylation site. It has been reported that long-term HFFD feeding causes GSK3 β activation associated with tau phosphorylation at PHF-1 (S396/404) and T231 (ref. 26). Tau phosphorylation sites have been extensively studied in terms of the impairment for microtubule binding and the formation of insoluble neurofibrillary tangles that

cause multiple anomalies, from axonal dysfunction to the loss of neuronal integrity and neuronal death.^{24–26,35}

Finally, we examined whether the biochemical, morphologic, and structural changes found in the hippocampus of HFFD rats were accompanied by reactive astrocyte activation. One of the pathologic features of obesity and InsRes is inflammation, and it has been described that central inflammation has an impact on brain function possibly through the import of inflammatory cytokines and immune cells into the central nervous system.^{31,36–38} Consistent with these reports, we found a significant increase in reactive astrocyte number and size in the hippocampus of HFFD rats, as well as GFAP+ subgranular cells extending vertical processes onto the granular layer of the DG of what we believe, based on morphology and location, is radial glia. In addition, we found slight changes in some microglial cells consistent in increased body size suggesting the onset of a subtle microglial activation. These results are indicative of neuroinflammatory changes within the hippocampus due to acute HFFD feeding.

The structural changes found in the hippocampus may arise from peripheral InsRes as well as alterations in hippocampal insulin signaling. However, an alternative explanation would be that differences in the metabolic balance of carbohydrates, and fats might have a direct effect on hippocampal plasticity and inflammation independently of peripheral metabolic alterations. It is possible that the high fructose intake promotes the increase in circulating triglycerides and accelerates the observed metabolic disturbances in the present model. However, additional studies will be necessary to parse the relative contributions of diet-induced alterations in lipid and glucose metabolism in the hippocampus.

In conclusion, we propose a model in which obesity and InsRes caused by a short-term HFFD feeding produce downregulation of hippocampal insulin signaling (Figure 6). This work provides novel evidence of the early biochemical and structural alterations in functional relevance caused by short-term HFFD feeding in the hippocampus, which ultimately might determine cognitive outcomes and disease susceptibility after longer exposure to a nutritional imbalance.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Tzippe Govezensky (UNAM) for helpful suggestions with the statistical analysis, and Dr Roger Gutiérrez-Juarez (Albert Einstein College of Medicine) for reviewing this manuscript.

REFERENCES

- 1 Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat fed rats. *Diabetes* 1991; **40**: 1397–1403.
- 2 Wang JL, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng ZH, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 2001; **50**: 2786–2791.
- 3 Lind L, Lithell H. Hypertension, hyperlipidemia, insulin resistance and obesity: Parts of a metabolic syndrome. *Blood Press Suppl* 1992; **4**: 49–54.
- 4 Meigs JB. Invited commentary: Insulin resistance syndrome? Syndrome x? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am J Epidemiol* 2000; **152**: 908–911.
- 5 Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ, Bray GA, Eckel RH *et al*. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the council of the obesity society. *Obesity* 2008; **16**: 1161–1177.
- 6 Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007; **87**: 507–520.
- 7 Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kareholt I, Winblad B *et al*. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2005; **62**: 1556–1560.

- 8 Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Br Med J* 2005; **330**: 1360–28.
- 9 Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry Jr. CP, Zhou J, Yaffe K. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res* 2007; **4**: 103–109.
- 10 Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 2003; **163**: 1524–1528.
- 11 Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience* 2002; **112**: 803–814.
- 12 Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM *et al*. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 2008; **18**: 1085–1088.
- 13 Belharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain Behav Immun* 2013; **37**: 134–141.
- 14 Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P *et al*. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 2006; **13**: 1385–1388.
- 15 Boitard C, Etchamendy N, Sauvant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A *et al*. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 2012; **22**: 2095–2100.
- 16 Granholm A-C, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimers Dis* 2008; **14**: 133–145.
- 17 Bingham EM, Hopkins D, Smith D, Pemet A, Hallett W, Reed L *et al*. The role of insulin in human brain glucose metabolism—an (18F)fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 2002; **51**: 3384–3390.
- 18 Wan Q, Xiong ZG, Man YH, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY *et al*. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 1997; **388**: 686–690.
- 19 Heras-Sandoval D, Ferrera P, Arias C. Amyloid-beta protein modulates insulin signaling in presynaptic terminals. *Neurochem Res* 2012; **37**: 1879–1885.
- 20 Zhao WQ, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ *et al*. Brain insulin receptors and spatial memory—correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34893–34902.
- 21 Skeberdis VA, Lan JY, Zheng X, Zukin RS, Bennett MVL. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3561–3566.
- 22 van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GMJ. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* 2005; **94**: 1158–1166.
- 23 Chiu S-L, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev* 2010; **5**: 2–18.
- 24 Mercado-Gomez O, Villavicencio-Queijeiro A, Massieu L, Chimal-Monroy J, Arias C. Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3 beta activity and induces morphological changes in cortical neurons: Role of tau phosphorylation. *Neurochem Res* 2008; **33**: 1599–1609.
- 25 Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M *et al*. Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci* 2007; **27**: 13635–13648.
- 26 Bhat NR, Thirumangalakudi L. Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *J Alzheimers Dis* 2013; **36**: 781–789.
- 27 Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, Elder BD, Bilz S, Befroy D *et al*. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; **279**: 32345–32353.
- 28 Baban RS KK, Al-Karawi IN. Fasting glucose to leptin ratio as a new diagnostic marker in patients with diabetes mellitus. *Oman Med J* 2010; **25**: 269–275.
- 29 Ono H, Pocal A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM *et al*. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2959–2968.
- 30 Oh H, Boghossian S, York DA, Park-York M. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Res* 2013; **1537**: 191–200.
- 31 Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK *et al*. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* 2013; **4**: 00231–00236.
- 32 Gold SM DI, Sweat V, Tirsi A, Rogers K, Bruehl H, Tsui W *et al*. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; **50**: 711–719.
- 33 Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE *et al*. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J Biol Chem* 2006; **281**: 229–240.
- 34 Takahashi RH C-ZE, Lin MT, Milner TA, Gouras GK. Accumulation of intraneuronal beta-amyloid 42 peptides is associated with early changes in microtubule-associated protein 2 in neurites and synapses. *PLoS ONE* 2013; **8**: e51965.
- 35 Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A *et al*. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 1996; **7**: 177–181.
- 36 Drake C, Boutin H, Jones MS, Denes A, McColl BW, Selvarajah JR *et al*. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav Immun* 2011; **25**: 1113–1122.
- 37 Laura B, Buckmana AHH, Flahertyb David K, Buckmanc Christopher T, Thompsona Misty M, Matlockb Brittany K *et al*. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* 2013; **35**: 33–42.
- 38 Freeman LR, Granholm AC. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; **32**: 643–653.

Resultados II. Modelo *in vitro* de administración subaguda y aguda de ácido palmítico en células de neuroblastoma humano

“Saturated fatty acids induce neuronal insulin resistance and mitochondrial dysfunction in isolated synapses and in vitro: role of mTOR/S6K”

Calvo-Ochoa Erika, Gómez-Inclán Cecilia, Quiroz-Báez Ricardo, Ferrera Patricia, Arias Clorinda. Manuscrito en preparación.

En la sección anterior se muestran los resultados de la caracterización de los efectos de la administración de una dieta HFFD subaguda sobre las neuronas y glía del hipocampo a nivel bioquímico, morfológico y estructural en un modelo *in vivo*, y se propuso un modelo integrativo en el cual se pueden relacionar todas las alteraciones que encontramos.

Adicionalmente, quisimos desarrollar un modelo de resistencia a la insulina neuronal *in vitro* mediante el cual se pueda estudiar los efectos de diferentes componentes de la dieta HFFD sobre las neuronas, así como los mecanismos moleculares responsables de dichas alteraciones. Debido a que uno de los componentes más perjudiciales presentes en la dieta HFFD son los ácidos grasos saturados, nos enfocamos en ellos. Algunos efectos nocivos de los ácidos grasos saturados están bien establecidos y se han reportado en modelos *in vivo* en tejidos como el hígado, páncreas y músculo esquelético (van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008), y también en modelos *in vitro* administrados de forma directa a cultivos celulares. El ácido graso saturado más abundante en la dieta HFFD que utilizamos para el modelo *in vivo* es el ácido palmítico (3.3% de la dieta). Además, se ha reportado que el ácido palmítico (AP) induce resistencia a la insulina en células hepáticas, y en neuronas hipotalámicas *in vitro*, promoviendo apoptosis (Lee et al. 2010; Benoit et al. 2010; Mayer et al. 2010). El ácido palmítico también puede modificar la composición lipídica de las membranas e induce estrés de retículo endoplásmico en células de glioblastoma y neuroblastoma, respectivamente, lo que lleva en ambos casos a muerte por apoptosis (Burratta et al. 2008; Kim et al. 2011).

Objetivo

Por lo tanto, el objetivo de la segunda parte de este trabajo fue desarrollar un modelo *in vitro* de administración subaguda y aguda de ácido palmítico en células de neuroblastoma humano diferenciadas a neuronas.

Materiales y métodos

Cultivo de neuroblastoma humano diferenciadas – Cultivos celulares de neuroblastoma humano MSN (Reynolds et al. 1986) se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino inactivado a 60°C al 10% (v/v). Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por pozo y se incubaron a 37°C con 5% O₂ y 85% CO₂. Después de 24 hrs de cultivo las células se diferenciaron a neuronas con un tratamiento de ácido retinoico 10µM y NGF 50ng/ml durante 5 días. Al terminar el periodo de diferenciación se reemplazó el medio por medio fresco y se añadieron los tratamientos con ácido palmítico durante 1 o 24 hrs.

Preparación de ácido palmítico – Se prepara un stock de palmitato de sodio (Sigma) a 200mM en etanol absoluto de grado molecular. Se disuelve con movimiento constante por unos minutos y se hace una dilución posterior a 5mM en PBS-BSA 10% previamente filtrado. Se mantiene la solución a 37°C por lo menos 30 minutos y en movimiento constante para permitir la solubilización y posteriormente se almacena a -20°C. Previo a su uso se mantiene la solución a 37°C.

Ensayos de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano - Se colectan las células resuspendiéndolas en 500µl de PBS por pozo. De esta solución se toman 10µl y se agregan 10µl (1:1) de una solución de azul de tripano al 0.4% en PBS (p/v). Se toman 10µl de esta solución y se cuentan en un citómetro de Neubauer por duplicado. Se registra el número de células vivas y muertas y se reporta el porcentaje de células vivas por cada experimento.

Determinación de reducción MTT – Para las condiciones experimentales con ácido palmítico, las células fueron incubadas por 24 hrs en la presencia de diferentes concentraciones de ácido palmítico o con medio como control. Se retiró el medio y se agregaron 250 µl de medio sin suero por 1 hora para ayunar a las células. Los grupos tratados con ácido palmítico durante una hora se trataron con 200 µM durante este periodo de ayuno. Posteriormente se agregó 100 nm de insulina a los grupos experimentales y PBS a

los controles y se incubó a 37°C durante 15 minutos. A los grupos experimentales sin glucosa se les reemplazó el medio por PBS durante 1 hora, durante la cual se incubó con ácido palmítico a ciertos grupos experimentales y posteriormente se agregó insulina como se describió anteriormente. El grupo control de ácido palmítico más glucosa fue incubado en PBS con la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo (2 g/l). Los grupos experimentales tratados con los inhibidores fueron tratados con wortmanina 100nm o rapamicina 100nm por 1 hr durante el periodo de ayuno, algunos grupos experimentales fueron tratados simultáneamente con ácido palmítico por el mismo periodo de tiempo. Posteriormente, se trataron con insulina algunos de estos grupos experimentales. Finalmente, en todos los grupos experimentales se agregaron 25 µl de la solución de MTT (10% v/v) y se incubó durante 30 minutos. Se retiró el medio y se agregaron 800 µl de isopropanol ácido. Posteriormente se leyeron las muestras a 570 nm en un espectrofotómetro. En la Figura 17 se presenta un esquema del diseño experimental.

Western blots y análisis estadístico – Metodología completa se encuentra en las páginas 41, 42 y 44.

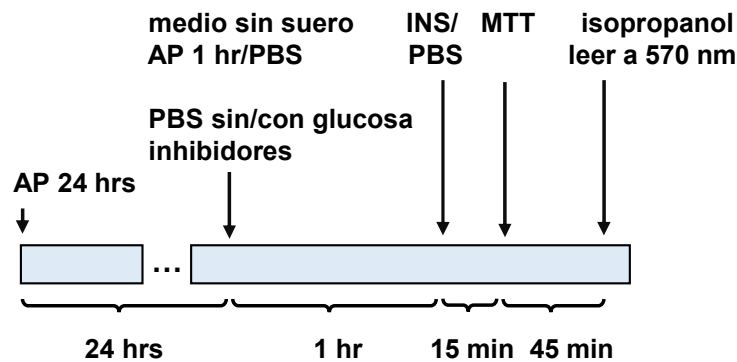


Figura 17. Diseño experimental y línea temporal de los puntos y tiempos de incubación que se utilizaron en el trabajo.

Curva dosis-respuesta en células de neuroblastoma diferenciadas tratadas con ácido palmítico por 24 horas para evaluar su neurotoxicidad.

En estudios previos se han determinado concentraciones de ácido palmítico (AP) que producen alteraciones gliales y neuronales *in vitro* (Patil et al, 2005; Patil et al, 2007; Benoit et al. 2010; Mayer et al. 2010). Asimismo, estas concentraciones de AP son similares a las encontradas en suero de animales y pacientes obesos y con dislipidemias (100 μ M- 200 μ M) (Rustan et al. 1992). Se usaron estas concentraciones de AP (100 μ M, 200 μ M y 500 μ M) para realizar una curva dosis-respuesta en dos ensayos de viabilidad celular para determinar si el tratamiento subagudo con ácido palmítico por 24 hrs., produce neurotoxicidad. Para ello se utilizaron dos métodos: un ensayo de reducción de MTT que determina la respiración mitocondrial y que es utilizado como ensayo de viabilidad celular *in vitro* (Mendoza-Oliva et al. 2013) y posteriormente un ensayo de exclusión con azul de tripano.

Se observó que el ácido palmítico induce una disminución de la respiración mitocondrial sólo a la concentración de 500 μ M (74.4% $P < 0.05$) (Figura 18). Estos resultados fueron replicados en el ensayo de azul de tripano, donde se observó una disminución de la viabilidad celular con el tratamiento de 500 μ M de AP (70.2% $P < 0.05$). Debido a que a 500 μ M se comienza a observar muerte neuronal, se utilizó la dosis de 200 μ M de AP para los experimentos posteriores.

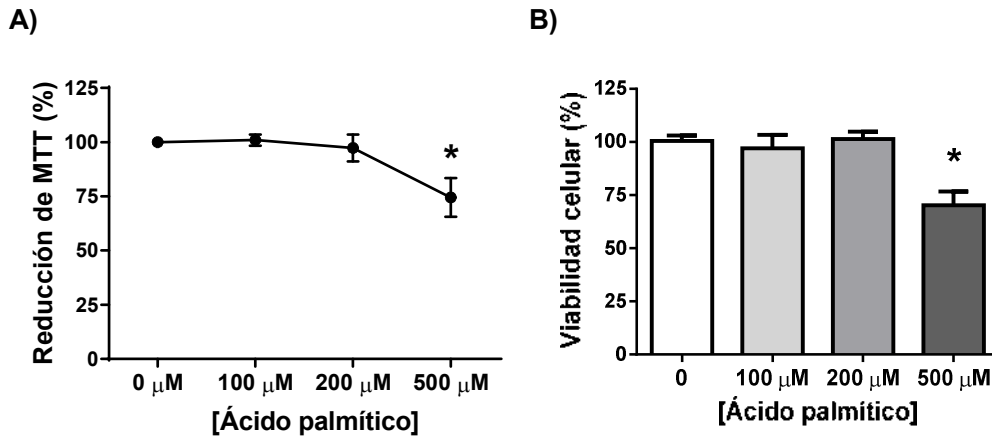


Figura 18. Ensayos de viabilidad celular con ácido palmítico. A) Ensayo de reducción de MTT B) Ensayo de exclusión de azul de tripano. Se muestra promedio y error estándar. n=4-5 experimentos independientes por duplicado para ambos ensayos. . * P <0.05 vs ctrl.

El ácido palmítico produce cambios en la sensibilidad a la insulina en células de neuroblastoma de forma dosis-dependiente.

Para estudiar si la administración subaguda de ácido palmítico produce cambios en la respuesta a insulina en neuronas analizamos la activación de diferentes proteínas de la cascada de señalización de la insulina. Se encontró que en el grupo control la insulina es capaz de inducir la activación de IRS-1 (p-IRS-1Y608), mientras que en células incubadas con 100 μM y 200 μM de AP está activación disminuye de forma significativa (38.43%, P<0.001 y 16.41%, P<0.0001, respectivamente)(Figura 19). De forma similar, la insulina es capaz de inducir la activación de Akt (p-AktS473), pero cuando las células tratadas con AP 200 μM, observamos una disminución significativa en esta activación (48.20%, P<0.05). Estos resultados indican que el tratamiento con ácido palmítico es capaz de disminuir la sensibilidad a la insulina en células de neuroblastoma diferenciadas de forma dosis-dependiente.

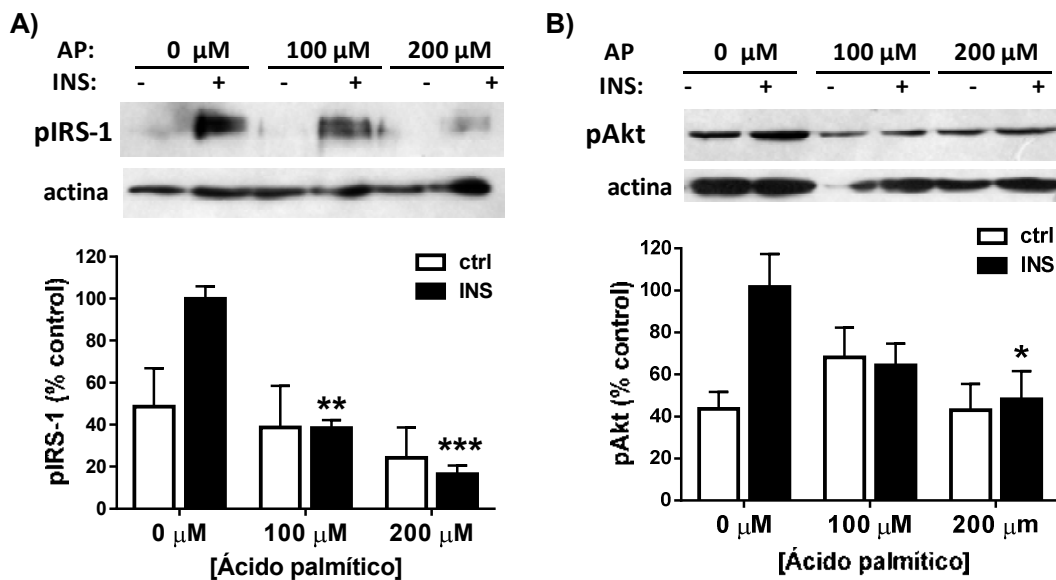


Figura. 19. Determinación de la señalización de insulina. Western blots de lisados de neuroblastomas diferenciadas tratadas con 100 μM o 200 μM AP por 24 horas, ayunadas 1 hr. y tratadas sin y con insulina 100 nM por 15 min. A) pY608-IRS-1. B) pS473-Akt. Se muestra promedi y error estándar. n=3 experimentos independientes. * P<0.05, **P<0.001, *** P < 0.0001 vs ctrl + INS

El tratamiento agudo, no así el sub-agudo, con ácido palmítico promueve una disfunción mitocondrial en respuesta a insulina en células de neuroblastoma.

Debido a que en el modelo *in vivo* encontramos que la HFFD disminuye la respiración mitocondrial en sinaptosomas tratados con insulina, quisimos explorar si la exposición al ácido palmítico *in vitro* podría tener un efecto similar. Para ello, se realizaron ensayos de MTT para determinar la respiración mitocondrial en neuroblastomas diferenciadas tratadas sin y con insulina y previamente incubadas con AP 200 μM. Se probaron dos tiempos ya que se quiso probar el efecto de la exposición aguda (1hr) y sub-aguda (24 hrs) de ácido palmítico. Encontramos que la insulina es capaz de inducir la respiración mitocondrial en neuroblastomas de forma significativa (31%, P<0.05), al igual que la incubación con AP por 1 hora (45.85%, P<0.001) (Figura 20).

Por otro lado, la incubación con AP por 24 horas no aumenta la actividad mitocondrial (-10.4%, ns vs. el control, significativo vs. el grupo tratado con insulina y el grupo tratado con AP). Interesantemente, de forma similar a lo que ocurre en el modelo *in vivo*, al agregar insulina a las células tratadas con ácido palmítico por 1hr no se observa el aumento en el MTT obtenido con ninguno de los dos compuestos por separado (0%, ns vs. el control, significativo vs. el grupo tratado con insulina y el grupo tratado con AP). Este efecto no se observa en células incubadas por 24 hrs con AP, donde se obtiene una respiración mitocondrial similar a la obtenida con insulina (18.23%, no significativo contra el grupo tratado con insulina).

Creemos que el grupo de AP 1hr + INS reproduce los resultados obtenidos en los sinaptosomas de ratas HFFD y sugerimos que se debe a un probable desacoplamiento mitocondrial debido a un exceso de ácidos grasos. Este mecanismo ha sido reportado por otros grupos como uno de los efectos de lipotoxicidad por ácidos grasos en tejidos periféricos (Rial et al. 2010; Hermesh et al. 2014). De forma interesante, este efecto se pierde cuando la incubación con ácido palmítico se realiza por 24 horas. Lo anterior sugiere que a pesar de que en las células exista un estado de resistencia a la insulina inducido por el ácido palmítico a 24 hrs, los efectos a nivel mitocondrial se ven desde tiempos más tempranos, y estos efectos se pierden a las 24 horas, posiblemente por un mecanismo de compensación mitocondrial.

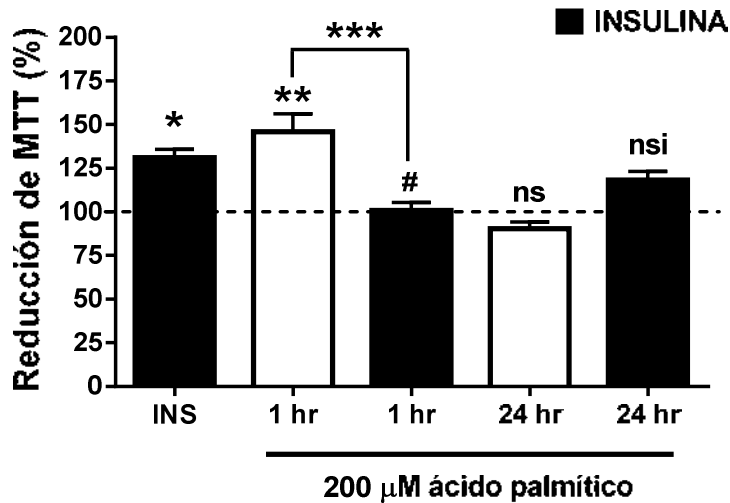


Figura 20. Evaluación de la actividad mitocondrial. Ensayo de reducción de MTT en neuronas incubadas sin y con ácido palmítico (AP) por 1 hr y 24 hrs y tratadas sin y con 100 nm de insulina por 15 min. n=6-10 experimentos independientes por duplicado. Se muestra el control en una línea punteada, promedio y error estándar. ns: no significativo vs CTRL, nsi: no significativo vs INS, * $p < 0.05$ vs CTRL, ** $p < 0.001$ vs CTRL, *** $p < 0.001$, # $p < 0.001$ vs INS.

La disfunción mitocondrial en respuesta a insulina mediada por el ácido palmítico es independiente de la entrada de glucosa a las neuronas.

Para estudiar con más detalle algunos elementos del aumento en la respiración mitocondrial obtenidos con insulina y AP por 1 hr, se determinó la reducción de MTT en ausencia de glucosa extracelular. No se encontraron diferencias entre el control sin glucosa (barra) y con glucosa (línea punteada) (-4.5%, ns) (Figura 21). Adicionalmente, se realizó un control de ácido palmítico al cual se le agregó glucosa (2mg/ml, concentración presente en el medio de cultivo) para asegurarnos que se obtiene una respuesta mitocondrial comparable a la obtenida en resultados anteriores. En este grupo, el MTT aumentó de forma significativa (36.78 %, $P > 0.001$).

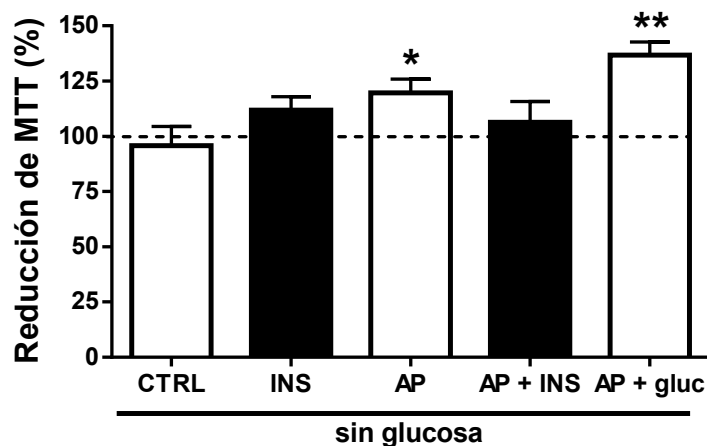


Figura 21. Evaluación de la actividad mitocondrial en ausencia de glucosa. Ensayo de reducción de MTT en neuronas incubadas sin glucosa, con ácido palmítico (AP) por 1 hr y tratadas sin y con 100 nm de insulina por 15 min. n=6-9 experimentos independientes por duplicado. Se muestra el control en una línea punteada. * p<0.05 vs, **p<0.001 vs ctrl.

Al incubar las células con insulina en ausencia de glucosa no se observó aumento significativo en la respiración mitocondrial contra el control sin glucosa (11.9%, ns) lo que sugiere que el aumento de reducción de MTT en neuroblastomas se debe, al menos parcialmente, a la entrada de glucosa a la célula. Por el otro lado, el ácido palmítico aumentó la respiración mitocondrial de forma significativa (19.67%, P<0.05). El grupo incubado con AP + INS no tuvo cambios en la reducción de MTT (6.2%, ns), lo que indica que el mecanismo de disfunción mitocondrial en respuesta a insulina mediado por el ácido palmítico es independiente de la entrada de glucosa a las células. Es importante mencionar que no existen diferencias entre los grupos AP y AP + glucosa.

La disfunción mitocondrial en respuesta a insulina mediada por el ácido palmítico requiere a la vía de señalización de mTOR/S6K.

Posteriormente para estudiar si el ácido palmítico produce la disfunción mitocondrial en respuesta a insulina mediada por la vía de señalización mTOR/S6K, la cual se activa por altos nutrientes, se realizaron ensayos de MTT en presencia del inhibidor específico de mTOR, la rapamicina. Encontramos que la incubación con rapamicina no cambia los niveles basales de MTT con respecto al control sin tratamiento (5.3%, ns) (Figura 22). Sin embargo, la preincubación con rapamicina inhibe la respiración mitocondrial inducida tanto por insulina (19.6%, ns), como por ácido palmítico (19.1%, ns), lo que implica que el aumento en la reducción de MTT obtenido por ambos compuestos depende de la activación de mTOR. De forma inversa, la rapamicina es capaz de revertir el efecto del AP con insulina sobre la respiración mitocondrial (61.3%, $P < 0.05$).

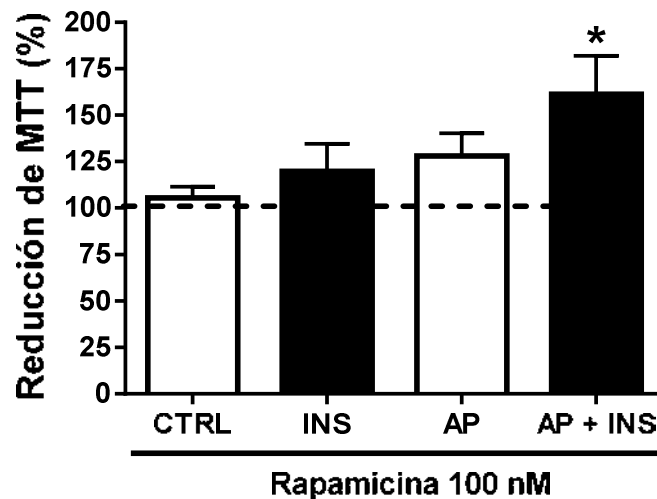


Figura 22. Evaluación de la actividad mitocondrial con la inhibición de mTOR. Ensayo de reducción de MTT en neuronas incubadas con rapamicina 100 nm por 1 hr, con ácido palmítico (AP) por 1 hr y tratadas sin y con 100 nm de insulina por 15 min. $n=6-10$ experimentos independientes por duplicado. Se muestra el control en una línea punteada. * $p < 0.05$ vs ctrl.

La disfunción mitocondrial en respuesta a insulina mediada por el ácido palmítico se revierte al inhibir a PI3K.

Debido a que nuestros resultados muestran que se presenta disfunción mitocondrial debido al ácido palmítico sólo cuando se trata a las neuronas con insulina, quisimos estudiar la participación de la vía PI3K/Akt en este fenómeno. Para ello se realizaron ensayos de MTT utilizando el inhibidor específico de PI3K, la wortmanina. Se encontró que la incubación con wortmanina no cambia los niveles basales de MTT con respecto al control sin tratamiento (5.38%, ns) (Figura 23). Por otro lado, la preincubación con wortmanina inhibe la respiración mitocondrial inducida por insulina (13.7%, ns), pero no así la respiración inducida por el ácido palmítico (52.65%, $P < 0.05$), lo que muestra que el aumento en MTT producido por el AP es independiente de la activación de PI3K. Asimismo, se observó un aumento en el MTT en el grupo de AP + INS incubado con wortmanina (44.3%, $P < 0.05$). Lo anterior sugiere que PI3K media la disfunción mitocondrial resultante de la co-incubación de AP con insulina.

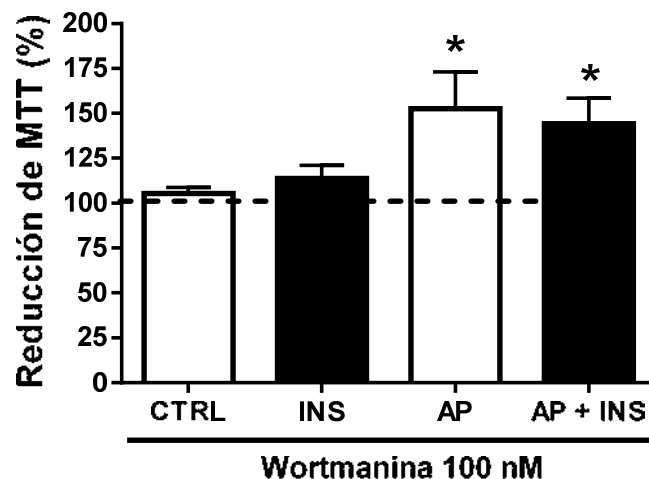


Figura 23. Evaluación de la actividad mitocondrial con la inhibición de PI3K. Ensayo de reducción de MTT en neuronas incubadas con wortmanina 100 nm por 1 hr, con ácido palmítico (AP) por 1 hr y tratadas sin y con 100nm de insulina por 15 min. n=6-10 experimentos independientes por duplicado. Se muestra el control en una línea punteada. * $p < 0.05$ vs ctrl.

Discusión

La resistencia a la insulina ligada a la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, las demencias y la Enfermedad de Alzheimer son enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, respectivamente, que han alcanzado proporciones epidémicas en la sociedad moderna. El aumento en la expectativa de vida aunado al estilo de vida sedentaria y a la ingesta de dietas occidentales hipercalóricas, apunta a que la incidencia de estas enfermedades seguirá aumentando de forma considerable en el futuro de la población. La búsqueda de la etiología así como el desarrollo de fármacos para tratar y prevenir estas enfermedades de forma individual ha sido uno de los desafíos más grandes de la investigación básica y clínica de las últimas décadas (Elliott et al. 2002; Shapiro et al. 2008; Bocarsly et al. 2010).

Aunado a lo anterior, la asociación entre las enfermedades metabólicas y el desarrollo de déficits cognitivos, demencias y Enfermedad de Alzheimer ha sido documentada y estudiada de forma amplia. Sin embargo, ya que tanto las enfermedades metabólicas como las deficiencias cognitivas son padecimientos de etiología multifactorial, elucidar los mecanismos celulares y moleculares implicados en esta compleja asociación, ha sido una tarea monumental. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento de estos padecimientos de forma conjunta e integral, es un ideal muy lejano.

Actualmente se encuentran en la literatura varias hipótesis sobre la relación entre la obesidad y la diabetes con el desarrollo de déficits cognitivos y Enfermedad de Alzheimer. Existen múltiples reportes del papel de la insulina en procesos de memoria y aprendizaje en zonas del cerebro de alta plasticidad como la corteza y el hipocampo (Zhao et al. 1999; Skeberdis et al. 2001; Gerozissis, K. 2003; Nelson et al. 2005; Huang et al. 2010). Asimismo, se sabe que una disfunción en la señalización a insulina es la responsable de las alteraciones metabólicas más importantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Meigs et al. 2000; Samuel et al. 2001; Weir et al. 2001; Ali et al. 2015; Gustafson et al. 2015). En conjunto, esta evidencia ha llevado a proponer por algunos grupos la hipótesis de la disfunción a la insulina sistémica y en el sistema nervioso

central como un componente determinante de la relación entre las enfermedades metabólicas y neurodegenerativas antes mencionadas. Los múltiples trabajos que apoyan esta hipótesis han sido desarrollados en varios modelos animales, lo cual ha brindado un cúmulo de información consistente y reproducible, pero también algunas contradicciones, lo cual ha llevado a revisiones y discusiones sobre los modelos para realizar estos estudios (Calvo-Ochoa y Arias, 2015).

Adicionalmente, una de las preguntas importantes que quedaba sin contestar, era si existían alteraciones en la señalización de insulina neuronal como respuesta a alteraciones metabólicas. Para contestar esta pregunta, primero desarrollamos un modelo animal que representa las condiciones alimenticias hipercalóricas prevalentes en occidente, mediante la ingesta de dietas altas en grasas saturadas y fructosa (HFFD). Posteriormente, desarrollamos un modelo *in vitro* de exposición a altas concentraciones de ácido palmítico en neuronas, y en ambos casos estudiamos si existían cambios en la sensibilidad a la insulina neuronal.

Encontramos en ambos modelos una disminución considerable a la respuesta a la insulina neuronal como respuesta a altos ácidos grasos saturados. Estos resultados respaldan la hipótesis de la disfunción de insulina sistémica y en sistema nervioso central como un componente principal de la relación entre las alteraciones metabólicas y los déficits cognitivos y demencias. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que el exceso de ácidos grasos saturados libres presentes en la obesidad, síndrome de resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2, es uno de los principales componentes responsables de la resistencia a la insulina neuronal. En este sentido ha sido reportado en un estudio en pacientes sanos que en un paradigma de resistencia a la insulina por infusión de lípidos sistémica, se produce una reducción en el metabolismo energético mitocondrial del hipocampo durante la ejecución de tareas cognitivas (Emmanuel et al. 2013).

Otro hallazgo importante relacionado con la resistencia a la insulina neuronal fue la disminución de la actividad mitocondrial en respuesta a insulina en ambos modelos. La disfunción mitocondrial es una característica fisiopatológica temprana de demencias y la

Enfermedad de Alzheimer, ya que lleva a daño y disfunción sináptica antes de que existan alteraciones cognitivas o muerte neuronal evidente (Mungarro-Menchaca et al. 2002; Luque-Contreras et al. 2014; Muriach et al. 2014).

En este sentido proponemos que la resistencia a la insulina hipocampal debida a altos ácidos grasos tiene como consecuencia funcional una disminución en la respuesta mitocondrial a insulina; ésta es seguida de daño sináptico, el cual demostramos mediante la disminución de espinas dendríticas y marcadores sinápticos; y finalmente planteamos que estos fenómenos traen como consecuencia la disminución en la ejecución de tareas de memoria y aprendizaje.

Nuestro estudio sobre la estructura y función hipocampal en respuesta a la administración a corto plazo de una dieta alta en grasa y fructosa (HFFD) es el primero existente en la literatura, ya que todos los estudios previos que describen la disminución en el desempeño de tareas cognitivas y alteraciones en el hipocampo debido a dietas altas en grasa han sido por periodos de administración de al menos 4 semanas. Para el uso de este modelo, se validaron varios parámetros metabólicos y hormonales indicativos de obesidad y de resistencia a la insulina sistémica. Es importante mencionar que a pesar de que no se encontró hiperinsulinemia, la cual es característica en el síndrome de resistencia a la insulina, observamos un ligero desplazamiento de la distribución de la concentración de insulina sérica hacia niveles más elevados en el grupo HFFD. En este sentido, se obtuvo una correlación positiva de la relación entre los niveles séricos de leptina e insulina de cada rata, lo cual nos sugiere que los niveles de ambas hormonas se relacionan con el estado metabólico y que tienden a aumentar en conjunto cuando se presentan alteraciones metabólicas, como la resistencia a la insulina. Este análisis ha sido reportado previamente por grupos que lo utilizan como marcador de enfermedades metabólicas en modelos animales y en pacientes humanos (Silha et al. 2003; Inoue et al. 2006; Baban et al. 2010).

Al evaluar la sensibilidad del hipocampo a la insulina después de la administración de HFFD, encontramos una disminución en la señalización de los efectores más importantes

de la vía, pero no así del receptor de insulina. Lo anterior nos sugiere lo siguiente: 1) los receptores de insulina hipocampales de las ratas HFFD son funcionales, 2) los niveles de insulina hipocampal en ambos grupos son equiparables y 3) la vía de señalización se ve afectada de forma intracelular, a nivel del IRS-1, que es incapaz de reconocer al receptor de insulina fosforilado y autofosforilarse.

Se ha descrito que uno de los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a la insulina sistémica es la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina por varias cinasas como S6K, JNK y PKC. Esta fosforilación produce un cambio alostérico en IRS-1 que le impide reconocer al receptor de insulina fosforilado y propagar la señal (Samuel et al., 2004; Ono et al., 2008; Oh et al., 2013). En este sentido, encontramos que la cinasa S6K, la cual es activada preferencialmente por nutrientes, se encuentra más activa en el hipocampo de ratas HFFD, lo cual sugiere que esta cinasa podría fosforilar a IRS-1 en residuos de serina y promover el desacople en la señalización de insulina hipocampal que observamos.

Además de los cambios metabólicos y bioquímicos observados en el hipocampo posterior a la ingesta subaguda de HFFD, también encontramos cambios estructurales importantes que podrían estar relacionados con los déficits cognitivos que se observan en los modelos de alteraciones metabólicas por HFFD. El primero de estos cambios fue una reducción en el peso del hipocampo, en correlación con la ingesta calórica de los animales y sin cambios en el peso total del cerebro. En relación con este hallazgo, se ha encontrado una reducción del volumen hipocampal en pacientes con DMT2, mientras que el volumen cerebral total permanece sin cambios (Gold et al. 2007). Es importante mencionar que la reducción del peso del hipocampo que observamos en las ratas HFFD podría deberse no sólo a los cambios estructurales y morfológicos neuronales que describimos en este trabajo, sino también a otros efectos de la dieta, como por ejemplo: deshidratación del tejido, a un cambio en la composición lipídica y/o de colesterol de las membranas, etc. (Sallam et al. 2015).

En un estudio morfológico más detallado encontramos una disminución en la arborización y el grosor dendríticos, así como reducción en el número de espinas dendríticas y marcadores sinápticos. Se sabe que los cambios en el tamaño, forma y número de las espinas dendríticas, así como la composición de las proteínas sinápticas presentes en ellas, son un componente fundamental de la plasticidad sináptica, la cual representa uno de los sustratos celulares del aprendizaje y la memoria (Moser et al. 1994; Engert y Bonhoeffer, 1999; Zhou et al. 2004; Kasai et al. 2010; Zhang et al. 2012). Por otro lado, se sabe que una disminución en el número y tamaño de espinas dendríticas hipocampales está relacionada con la pérdida de las funciones cognitivas en diferentes modelos de neurodegeneración, Enfermedad de Alzheimer y déficits cognitivos (Knobloch y Mansuy, 2008; Rubino et al. 2009; Dumitriu et al. 2010; Kasai et al. 2010).

Las modificaciones estructurales en estas zonas neuronales altamente plásticas muestran que la HFFD produce alteraciones en la dinámica activa de remodelación dendrítica y sináptica, y aumentan la información disponible en la literatura en cuanto a los mecanismos moleculares asociados con la disminución de la función cognitiva (Popov & Bocharova 1992; Lambert et al. 1998; Masliah et al. 2004; Magariños et al. 2006; Titus et al. 2007; Ivy et al. 2010). Debido a que está reportado que la administración de HFFD a largo plazo promueve una disminución en la producción hipocampal del factor de crecimiento BDNF (brain-derived neuronal factor), y ya que éste es uno de los factores principales que promueven la remodelación dendrítica y que regulan el número y la maduración de espinas dendríticas, así como el establecimiento de la potenciación a largo plazo, nos sugiere que es uno de los mecanismos que podría estar involucrado en las modificaciones estructurales que encontramos en nuestro modelo (Hall et al. 2000; Tyler et al. 2002; Molteni et al. 2004; Radecki et al. 2005; Hu et al. 2005; Greenberg et al. 2009; Chen et al. 2010; Park et al. 2010).

Las proteínas asociadas al citoesqueleto controlan su ensamblaje y por ello regulan procesos de ajuste morfológico dendrítico y neuronal asociado con cambios en la plasticidad dendrítica, axónica y sináptica. Encontramos que la administración de HFFD produce

cambios en dos de estas proteínas (dendríticas y axónicas) lo cual podría relacionarse directamente con los cambios estructurales encontrados en las neuronas.

MAP-2, proteína asociada a los microtúbulos de las dendritas, se encuentra reducida y relocalizada hacia el soma en las neuronas hipocámpales de las ratas HFFD. Existen reportes de disminución y relocalización somática de MAP-2 en diferentes enfermedades degenerativas, incluyendo la Enfermedad de Alzheimer (Fifre et al., 2006; Takahashi et al., 2013). Adicionalmente, se reportó que el consumo de una dieta alta en grasas por largo plazo, produjo una reducción de MAP-2 en el hipocampo y que esta disminución correlacionó con el número de errores en una prueba de memoria (Granholm et al. 2008), lo cual relaciona directamente la pérdida de la función de MAP-2 con una pérdida cognitiva.

Por otro lado encontramos cambios en la fosforilación de tau, proteína asociada a microtúbulos en los axones, y la cual se regula mediante la fosforilación de sus múltiples epítomos. Estudiamos la fosforilación del epítomo S199/202 ya que es un sitio fosforilado preferencialmente por la cinasa GSK3 β que es inhibida directamente por la vía de la insulina, la cual está desensibilizada en nuestro modelo de HFFD. Tau puede sufrir una hiperfosforilación patológica que se lleva a cabo en múltiples residuos y por varias cinasas que fosforilan de manera secuencial. Estas fosforilaciones aberrantes pueden promover la disociación de tau de los microtúbulos y posteriormente la formación de fibrillas insolubles que causan múltiples anomalías, desde la disfunción axonal hasta la pérdida de la integridad neuronal y posteriormente la muerte celular. (Kimura et al., 1996; Planel et al., 2007; Mercado-Gómez et al. 2008; Bhat et al., 2013).

Otro componente importante asociado con las alteraciones metabólicas, en particular con la obesidad, es la inflamación de bajo grado. Se sabe que en estas enfermedades se producen cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que produce un tráfico de citocinas inflamatorias y macrófagos hacia el sistema nervioso central, incluido el hipocampo (Drake et al. 2011; Freeman et al. 2012; Buckman et al. 2013; Laura et al.

2013). Por ese motivo estudiamos marcadores de inflamación en el hipocampo debidas a la ingesta de HFFD, y encontramos activación tanto astrocítica como microglial.

Recientemente se ha demostrado el papel fundamental que tienen los astrocitos en la regulación de la remodelación sináptica y en el establecimiento de plasticidad en el hipocampo (Cristopherson et al. 2005; Nishida y Okabe, 2007; Eroglu y Barres, 2010; Pekny y Pekna, 2014). Asimismo los astrocitos reactivos, que han sido activados por varios estímulos aversivos o dañinos, pueden en primera instancia resultar neuroprotectores y neuromoduladores, pero después de una activación continua producir daño y pérdida sináptica (John et al. 2003; Liberto et al. 2004; Wilhelmsson et al. 2004; Sofroniew et al. 2005; Rao et al. 2012; Ávila-Muñoz y Arias, 2014). En este sentido, la presencia continua de marcadores inflamatorios sistémicos y en el hipocampo por la administración de dietas HFFD podría relacionarse también con la disminución en el número de espinas dendríticas que observamos en nuestro modelo. Otro hallazgo interesante fue encontrar células subgranulares del giro dentado que expresan a la GFAP (glial-fibrillary astrocytic protein) astrocítica. Basados en la posición y morfología de dichas células, proponemos que son glia radial las cuales extienden un gran número de procesos celulares a través de la capa granular del giro dentado en las ratas HFFD. Estos resultados sugieren un efecto protector, o inclusive de andamiaje hacia las capas neuronales del giro dentado. Este tipo de procesos de neuroprotección se han observado en otros modelos de daño en el giro dentado (Huttmann et al. 2003; Lugert et al. 2010).

La presencia de microglia activa en el hipocampo sugiere una importación de macrófagos activos desde la periferia, lo cual sugiere que existen cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por administración aguda de HFFD como ha sido descrito en otros modelos de alteraciones metabólicas.

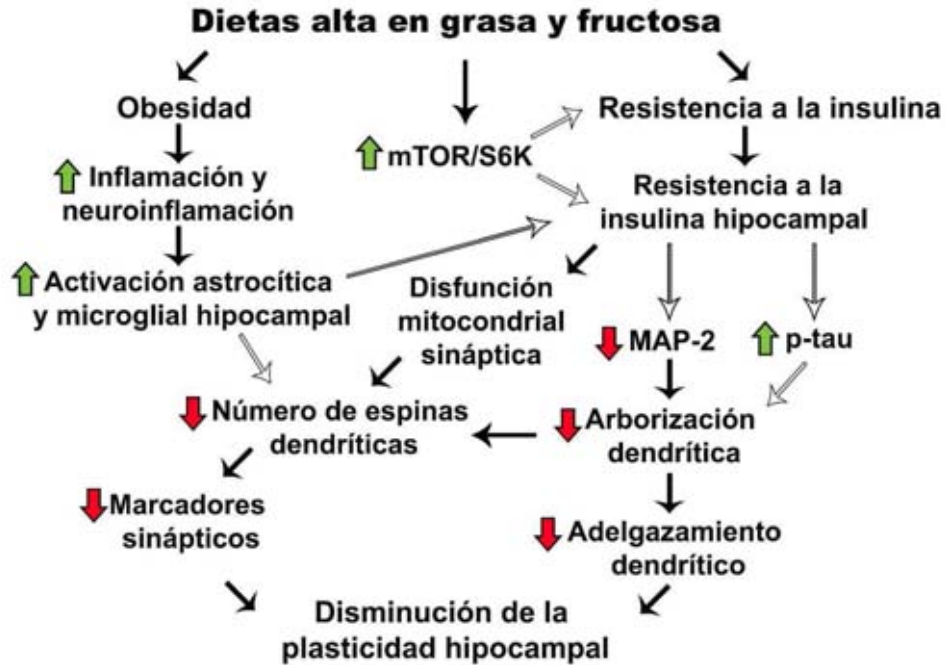


Figura 24. Modelo integrativo propuesto de los resultados obtenidos en el modelo de administración subaguda de HFFD. Se muestra un esquema de los resultados obtenidos en este trabajo y de la literatura. En flechas verdes se muestran aquellos parámetros que se encontraron aumentados, en flechas rojas se presentan aquellos que se encontraron disminuidos. Se presentan en flechas negras las posibles relaciones entre dos parámetros en base a diversos reportes en la literatura. Se presenta en flechas blancas nuestras propuestas de relaciones entre parámetros, que tendrán que validarse experimentalmente.

A forma de conclusión gráfica de la primera parte de la discusión, correspondiente al modelo de administración subaguda de dietas HFFD *in vivo*, proponemos un modelo en el cual integramos los hallazgos de este trabajo y los relacionamos con fenómenos previamente reportados en la literatura (Figura 24).

Las diferentes alteraciones neuronales y gliales en el hipocampo debidos a la HFFD que reportamos en este trabajo muy probablemente son de origen multifactorial. Para probar la hipótesis del papel de los ácidos grasos saturados en el desarrollo de la resistencia a la insulina, desarrollamos un modelo en el cual se expusieron altas concentraciones de ácido

palmítico a neuronas in vitro. Encontramos que la exposición a muy altas concentraciones de ácido palmítico por 24 hrs produce muerte neuronal, lo cual coincide con los reportes de que el ácido palmítico produce apoptosis en otros cultivos celulares neuronales (Lee et al. 2010; Benoit et al. 2010; Burratta et al. 2008; Mayer et al. 2010; Kim et al. 2011).

Posteriormente encontramos el que la incubación por 24 hrs con ácido palmítico produce pérdida de sensibilidad a la insulina en las neuronas de forma dosis-dependiente, lo que indica que los efectos deletéreos sobre la señalización de insulina relacionan directamente con el metabolismo o la señalización de los ácidos grasos saturados.

Estudiamos la función mitocondrial neuronal en respuesta a ácido palmítico y encontramos que a 1hr, pero no a 24 hrs, puede ser utilizado como sustrato metabólico, independientemente de la captura de glucosa. También observamos que la preincubación por 1 hr con ácido palmítico, impide el aumento de la actividad oxidoreductora mitocondrial producida por insulina. Creemos que estos resultados reproducen lo que observamos en el modelo in vivo en el cual la actividad mitocondrial de terminales sinápticas aisladas inducida por insulina, se abate en el grupo HFFD. Es importante mencionar que la incubación por 24 hrs con ácido palmítico no tuvo estos efectos. Más adelante se discutirán posibles explicaciones de este fenómeno en relación con los demás resultados.

Encontramos también que la insulina requiere de la captura de glucosa para aumentar la actividad mitocondrial en los neuroblastomas, lo que indica que transportadores de glucosa insulino-dependientes como GLUT4 o GLUT8 median esta función. Existen reportes de que varias líneas celulares de neuroblastoma expresan el transportador GLUT4, pero desconocemos si en la línea que utilizamos se expresa este transportador (Benomar et al. 2006; Patel et al. 2011; Rizzo et al. 2013).

Adicionalmente estudiamos el papel de las vías de señalización de mTOR/S6K y de PI3K en la activación mitocondrial inducida por insulina, AP y en la disfunción mitocondrial

obtenida de la co-incubación de ambos compuestos, y encontramos que la insulina requiere de la activación tanto PI3K como de mTOR para aumentar la actividad mitocondrial. PI3K media la activación de Akt, la cinasa que regula el transporte de GLUT4 hacia la membrana plasmática y que permite la captura de glucosa, necesaria para aumentar la actividad mitocondrial en este modelo (Figura 2). El requerimiento de mTOR en este caso puede explicarse, ya que a pesar de que de forma canónica se esquematiza la activación de mTOR río abajo de Akt y de forma lineal, se sabe que Akt requiere de dos fosforilaciones para activarse: la primera en un sitio fosforilado por mTOR, lo cual sirve como sitio “primer” para permitir la posterior fosforilación por PDK cuando esta se activa (Sarbasov et al. 2005; Hresko y Mueckler, 2005; Zeng et al. 2007). Ya que mTOR se activa por nutrientes y por factores de crecimiento, en células saludables y metabólicamente activas existirá una activación basal de esta cinasa que permite la primera fosforilación de Akt para favorecer su posterior activación. Por lo tanto al inhibir a mTOR esta fosforilación se pierde, lo que podría explicar el por qué la actividad mitocondrial no aumenta al tratar a las células con insulina y rapamicina.

Además encontramos que el ácido palmítico requiere de la vía de señalización de mTOR/S6K, pero no de PI3K, para inducir activación mitocondrial. Está bien establecido que los ácidos grasos promueven la activación de mTOR y que a su vez esta cinasa regula el metabolismo de éstos (Wang et al., 2001; Harrington et al., 2005; Um et al., 2006; Blouet et al., 2008; Ono et al., 2008; Soliman, 2011). Adicionalmente, resultados preliminares no incluidos en esta tesis sugieren que el tratamiento con ácido palmítico por 1 hora promueve la activación de S6K, lo cual confirmaría el papel de esta vía de señalización en los efectos del AP.

Finalmente nuestros resultados indican que la pérdida de la activación mitocondrial inducida por insulina con la co-incubación de ácido palmítico requiere de la activación tanto de PI3K como de mTOR. Con los resultados que obtuvimos no es posible explicar por completo el mecanismo molecular de la disfunción mitocondrial debida a la co-incubación de ácido palmítico con insulina, por lo que a continuación presentamos una

hipótesis de lo que podría estar ocurriendo y que requerirá su posterior validación experimental.

Se ha descrito que una parte esencial de la señalización de insulina es la generación de un pulso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado en respuesta a la unión de la insulina con su receptor (Mukherjee et al. 1978; May et al. 1979; Mahadev et al. 2001; Goldstein et al. 2005). Este pulso se genera de forma casi instantánea y es transitorio, durando de 5 a 10 segundos y se ha rastreado su origen al complejo II mitocondrial, la succinato deshidrogenasa. Esta generación pulsátil de H₂O₂ mitocondrial funciona como un “priming” que promueve la autofosforilación del receptor de insulina y por lo tanto es fundamental para la transducción de la señal (Schmid et al. 1998; Schmid et al. 1999; Pomytkin et al. 2002; Pomytkin et al. 2003; Storozhevykh et al. 2007; Persiyantseva et al. 2013). Sin embargo, es importante mencionar que la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) por tiempos y en concentraciones fisiopatológicas tienen un efecto inhibitorio en la señalización de insulina (Goldstein et al. 2005; Anderson et al. 2009).

Por otro lado, existe evidencia de que en paradigmas de exposición a altos ácidos grasos in vitro o mediante administración de dietas altas en grasas in vivo las células presentan un aumento en la generación de EROs mitocondriales, así como un incremento en el potencial máximo de generación de H₂O₂ mitocondrial, lo cual trae como consecuencia un aumento en la concentración de éste y por periodos más prolongados de tiempo (Koves et al. 2005; Bonnard et al. 2008; Anderson et al. 2009). El incremento en la generación de H₂O₂ mitocondrial tiene como consecuencia la disminución en la capacidad del sistema antioxidante, adicionalmente se promueve el escape de electrones de la cadena de transporte de electrones, lo cual ocasiona un posterior desacoplamiento mitocondrial (Korshunov et al. 1997; Liu et al. 1999; Tretter et al. 2000; Lameloise et al. 2001; Evans et al. 2005; Anderson et al. 2009; Moser et al. 2009).

En relación con nuestros resultados, es importante mencionar que la reducción de MTT a sales de formazán se lleva a cabo en gran medida por el complejo II mitocondrial, o la

succinato deshidrogenasa, la misma enzima que produce el H₂O₂ mitocondrial en respuesta a insulina (Slater et al. 1963; Musser y Osseoff, 1994; Takahashi et al. 2002). Tomando en cuenta todas las evidencias anteriores y nuestros resultados experimentales, nuestra hipótesis es la siguiente (Figura 25):

1) La incubación con ácido palmítico por 1 hora genera una gran cantidad de EROs mitocondriales, incluido el H₂O₂, lo que promueve un estado pro-oxidante, la disminución de equivalentes reductores, disrupción de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial y posterior escape de electrones de la cadena respiratoria, lo cual puede llevar al desacoplamiento mitocondrial (Ballinger et al. 2000; Lin y Beal, 2006; Hamanaka y Chandel, 2010).

2) Al añadir insulina, se genera un pulso de H₂O₂ por la succinato deshidrogenasa. Ya que las mitocondrias presentarían un incremento en el potencial máximo de generación de H₂O₂ así como menos capacidad anti-oxidante, el pulso de H₂O₂ generado por insulina sería mayor y duraría más tiempo, lo cual aumentaría aún más el estado oxidante mitocondrial.

3) Durante los 15 minutos de incubación de la insulina, en los cuales en los grupos control se ha generado una actividad metabólica que aumenta la reducción del MTT, en las células tratadas con ácido palmítico e insulina las mitocondrias se encontrarían en un estado pro-oxidante y con una disminución de los equivalentes reductores mitocondriales. Por lo tanto al agregar el MTT, la reducción de éste estaría disminuida en comparación con grupos tratados con AP o con insulina.

Creemos que este mecanismo también podría ser el responsable de la disminución en la reducción de MTT que observamos en las sinapsis hipocámpales de las ratas HFFD.

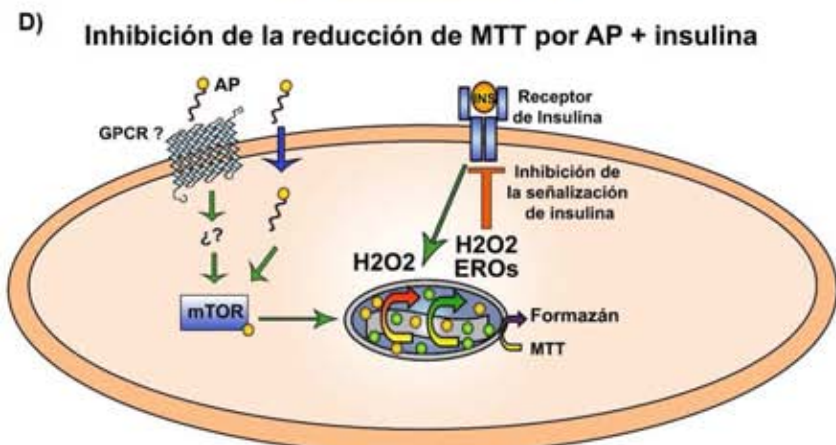
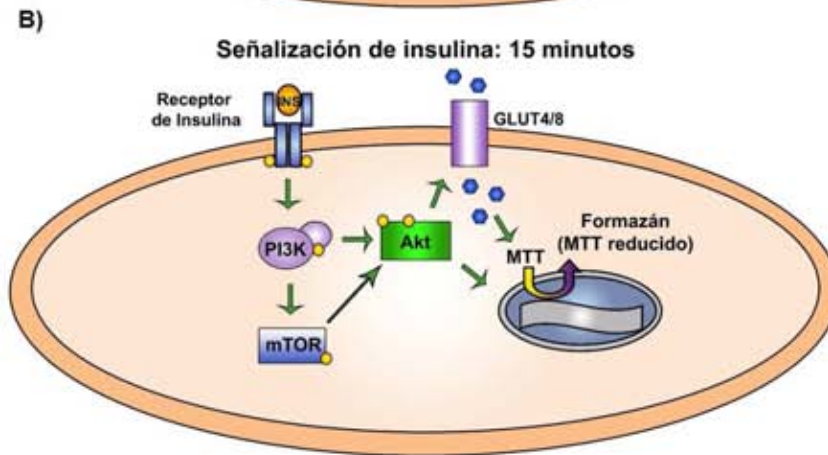
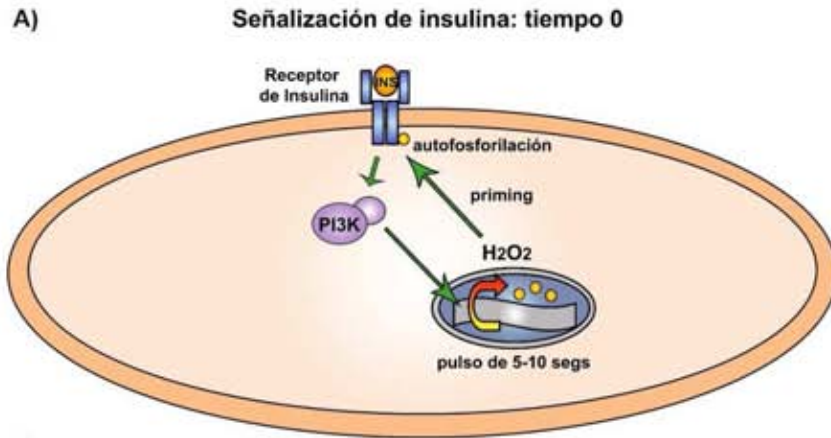


Figura 25. Modelo del mecanismo propuesto para la inhibición en la reducción de MTT en neuronas tratadas con ácido palmítico e insulina. A) Generación de un pulso rápido y transitorio de H_2O_2 mitocondrial en respuesta a la unión de insulina con su receptor. La generación de este H_2O_2 media la autofosforilación del receptor de insulina. Debido a nuestros resultados, creemos que PI3K es parte de esta primera parte de la vía de señalización de insulina. B) Señalización de insulina después de 15 minutos (tiempo de incubación que usamos en este trabajo) y reducción de MTT generada por la captación de glucosa y la posterior glucólisis. C) Generación de H_2O_2 y EROs mitocondriales por la incubación de AP durante 1 hora; reducción de MTT debida a la β -oxidación del AP. D) Hipótesis de la disminución de la reducción de MTT en respuesta a la insulina en neuronas pre-incubadas con AP. Durante la incubación con AP se generan H_2O_2 y EROs, los cuales se incrementan al tratar a la célula con insulina. Esta acumulación excesiva de EROs promueve una disminución de los equivalentes reductores generados por la β -oxidación, disrupción de la permeabilidad membranal y posible filtrado de electrones. Esto ocasionaría una disminución en la capacidad de la mitocondria para reducir el MTT. Adicionalmente, los EROs podrían promover un estado de resistencia a la insulina por lo que se perdería la captación de glucosa dependiente de insulina y el efecto de la glucólisis sobre la reducción de MTT.

Conclusiones

A pesar de que la relación entre el padecimiento de alteraciones metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes mellitus con el desarrollo de déficits cognitivos, demencias y Enfermedad de Alzheimer ha sido ampliamente descrita en estudios epidemiológicos y en modelos animales, se sabe muy poco sobre los mecanismos moleculares que subyacen esta relación.

Ya que uno de los componentes determinantes para el padecimiento de enfermedades metabólicas es la ingesta de dietas altas en grasas, nos enfocamos en este factor. Por ello, en el presente trabajo presentamos dos modelos para el estudio de la ingesta de dietas altas en grasas y su impacto en cambios estructurales, funcionales y bioquímicos en neuronas y glia.

En el primer modelo de ingesta sub-aguda de dietas altas en grasa de origen animal y fructosa *in vivo* demostramos que la obesidad y la resistencia a la insulina ocasionadas por esta dieta producen cambios en la sensibilidad a la insulina hipocámpal y que esto se asocia con cambios estructurales, funcionales, morfológicos y bioquímicos en esta región. Proponemos este modelo como uno de los más completos para el estudio de la relación entre alteraciones metabólicas y déficits cognitivos ya que se utilizan animales jóvenes, saludables y sin modificaciones genéticas. El desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina y de todas las alteraciones asociadas son dependientes exclusivamente de la administración de la dieta; Adicionalmente, la dieta HFFD usada es la más cercana a la dieta hipercalórica occidental humana, consistente en altas grasas saturadas de origen animal y alta fructosa en la bebida. Esta dieta, que es altamente obesogénica, es capaz de inducir obesidad y resistencia a la insulina en sólo 7 días, lo cual provee ventajas experimentales.

Posteriormente, en el segundo modelo de exposición a ácidos grasos saturados *in vitro* encontramos semejanzas con los resultados obtenidos en el modelo de administración de dieta HFFD en ratas, por lo que lo proponemos como un modelo de estudio alternativo de

los mecanismos moleculares que subyacen los cambios neuronales en respuestas a componentes específicos de las dietas altas en grasas. En particular, mostramos que la exposición aguda y sub-aguda de ácido palmítico promueve también cambios en la sensibilidad a insulina neuronal, relacionada con cambios en la actividad mitocondrial.

Los resultados de este estudio muestran por primera vez que la sensibilidad a la insulina cerebral reducida debida a alteraciones metabólicas puede asociarse con el desarrollo de alteraciones neuronales que lleven al deterioro cognitivo e inclusive, ser un factor de riesgo claro para enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer y también complementan la literatura respecto a las evidencias del papel de la insulina en la cognición.

La identificación de los mecanismos centrales y periféricos relacionados con la resistencia a la insulina y la neuroinflamación como mediadores potenciales de disfunción cognitiva y factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y déficits cognitivos puede llevar al desarrollo de estrategias preventivas y farmacológicas más efectivas para el tratamiento de ambos tipos de padecimientos.

Referencias

- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci*. 1999; 19: 7300-7308
- Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi P. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 1993. 268:17665-17668.
- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 117. 2004. 421-6.
- Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology*. 2009. 56(4):779-87.
- Ali AH, Mundi M, Koutsari C, Bernlohr DA, Jensen MD. Adipose Tissue Free Fatty Acid Storage In Vivo: Effects of Insulin Versus Niacin as a Control for Suppression of Lipolysis. *Diabetes*. 2015. 64(8):2828-35.
- Allison DB, Downey M, Atkinson RL, et al. Obesity as a disease: A white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obesity*. 2008; 16: 1161-1177
- Almkvist O, Basun H, Backman L, Herlitz A, Lannfelt L, Small B, et al. Mild cognitive impairment--an early stage of Alzheimer's disease? *J Neural Transm Suppl*. 1998; 54:21-9.
- Alzoubi KH, Aleisa AM, Alkadhi KA. Impairment of long-term potentiation in the CA1, but not dentate gyrus, of the hippocampus in Obese Zucker rats. *J Mol Neurosci*. 2005; 27: 337-346
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*. 2009; 119:573-81.
- Anderwald C, Roden M. Adipotoxicity and the insulin resistance syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2004. 1(3):310-9.
- Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonne S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia sp population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2014.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L. beta-amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2002; 176: 163-174
- Avila-Munoz E, Arias C. When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2014; 18:29-40.
- Avrahami L, Licht-Murava A, Eisenstein M, Eldar-Finkelman H. GSK-3 inhibition: achieving moderate efficacy with high selectivity. *Biochim Biophys Acta*. 2013.1834:1410-4
- Baban RS KK, Al-Karawi IN. Fasting glucose to leptin ratio as a new diagnostic marker in patients with diabetes mellitus. *Oman Med J* 2010; 254:269-75.

- Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide- and peroxyxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000; 869:960-6.
- Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacol Therap*. 2012; 136: 82-93
- Baura GD, Foster DM, Porte D, et al. Saturable Transport of Insulin from Plasma into the Central-Nervous-System of Dogs in-Vivo - a Mechanism for Regulated Insulin Delivery to the Brain. *J Clin Invest*. 1993; 92: 1824-1830
- Beeri MS, Goldbourt U, Silverman JM, et al. Diabetes mellitus in midlife and the risk of dementia three decades later. *Neurology*. 2004; 63: 1902-1907
- Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, Born J, Kern W. Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology*. 2007; 86: 136-142
- Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest*. 2009; 1199:2577-89.
- Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, et al. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology*. 147. 2006. 2550-6.
- Bhat NR TL. Increased tau phosphorylation and impaired brain Insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *J Alzheimers Dis* 2013; 364:781-9.
- Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJ, Gilbert M, Karpe F, Frayn KN. Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes*. 2007. 56(1):168-76.
- Biessels GJ, Kamal A, Urban IJA, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res*. 1998; 800: 125-135
- Biessels GJ, Kappelle LJ. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 1041-1044
- Bingham EM, Hopkins D, Smith D, et al. The role of insulin in human brain glucose metabolism - An (18)fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes*. 2002; 51: 3384-3390
- Bjornholm M, Zierath JR. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans*. 33. 2005. 354-7.
- Bjornholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SC, Lienhard GE, Taylor S, Arner P, Zierath JR: Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* 2002, 45(12):1697-1702.
- Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010. 101-6.
- Boitard C, Etchamendy N, Sauviant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 2012; 2211:2095-100.

- Boitard C, Etchamendy N, Sauvant J, et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*. 2012; 22: 2095-2100
- Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. *J Clin Invest*. 2014
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*. 2008; 118:789-800.
- Boucher J, Tseng YH, Kahn CR. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J Biol Chem*. 285. 2010. 17235-45.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000; 289: 2122-2125
- Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2013; 41:300231-6.
- Buratta M, Castigli E, Sciacaluga M, Pellegrino RM, Spinozzi F, Roberti R, et al. Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. *J Neurochem*. 105. 2008. 1019-31.
- Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*. 27. 2002. 352-60.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE: Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003. 278. 25323-25330.
- Canello R, Clement K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 113. 2006. 1141-7.
- Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2007; 282: 36275-36282
- Carobbio S, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011. 14(6):520-6.
- Ceolotto G, Bevilacqua M, Papparella I, Baritono E, Franco L, Corvaja C, et al. Insulin generates free radicals by an NADPH, phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. *Diabetes*. 2004; 53:1344-51.
- Charles BA, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Chen G, Shriner D, et al. The roles of IL-6, IL-10, and IL-1RA in obesity and insulin resistance in African-Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 96. 2011. E2018-22.
- Chen LY, Rex CS, Pham DT, Lynch G, Gall CM. BDNF signaling during learning is regionally differentiated within hippocampus. *J Neurosci*. 30. 2010. 15097-101.
- Chen Q, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang YW, Zhong M, et al. Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochem Int*. 2011. 233-42.
- Cheng Z, Guo S, Copps K, Dong X,

- Kollipara R, Rodgers JT, et al. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nat Med*. 15. 2009. 1307-11.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 21. 2010. 589-98.
- Chiu S-L, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev* 2010; 5.
- Chlouverakis.C, White PA. Obesity and insulin resistance in obese-hyperglycemic mouse (ob/ob). *Metabolism*. 1969; 18: 998
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 120. 2005. 421-33.
- Cid MP, Arce A, Salvatierra NA. Acute stress or systemic insulin injection increases flunitrazepam sensitive-GABAA receptor density in synaptosomes of chick forebrain: Modulation by systemic epinephrine. *Stress*. 2008.11:101-7.
- Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GVW, Jope RS. Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes*. 2006; 55: 3320-3325
- Cohen MM, Jr. The AKT genes and their roles in various disorders. *Am J Med Genet A*. 2013; 161 12:2931-7.
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J, et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem*. 275. 2000. 21960-8.
- Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance. *J Endocrinol Diabetes Obes*. 2013 1(1):1008.
- Craft S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: Potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res*. 2007; 4: 147-152
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1987; 782:151-64.
- De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*. 1996; 1533-9.
- de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M, Jr., Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*. 2006; 10: 89-109
- de la Monte SM. Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2012; 9: 35-66
- De Taeye BM, Novitskaya T, McGuinness OP, Gleaves L, Medda M, Covington JW, et al. Macrophage TNF-alpha contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293. 2007.
- Deng Y, Li B, Lu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong C-X. Dysregulation of Insulin Signaling, Glucose Transporters, O-GlcNAcylation, and Phosphorylation of Tau and Neurofilaments in the Brain Implication for Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*. 2009; 175: 2089-2098
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene-expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. 1994; 269: 8445-8454

- Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ. Insulin-ii gene-expression in rat central-nervous-system. *Regul Pept.* 1993; 48: 55-63
- Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms Underlying Insulin Deficiency-Induced Acceleration of beta-Amyloidosis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 2012; 7:
- Diano S, Liu ZW, Jeong JK, Dietrich MO, Ruan HB, E, et al. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med.* 17. 2011.
- Dietz WH. Overweight in childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 350. 2004. 855-7.
- Dik MG, Jonker C, Comijs HC, et al. Contribution of metabolic syndrome components to cognition in older individuals. *Diabetes Care.* 2007; 30: 2655-2660
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011. S52-9.
- Doerge H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology* 2006. 21: 259-268.
- Dorn A, Rinne A, Bernstein H, Hahn H, Ziegler M. Insulin and C-peptide in human brain neurons *J Hirnforsch* 1983. 2 5:495-49.
- Drake C, HB, MSJb, ADa, BWMa, et al. Brain inflammation is induced by comorbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav Immun* 2011; 25:1113-22.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999; 103:253-9.
- Duarte AI, Proenca T, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes.* 2006; 55: 2863-2870
- Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3 beta signaling pathways and changes in protein expression. *BBA-Mol Cell Res.* 2008; 1783: 994-1002
- Dumitriu D, Hao J, Hara Y, Kaufmann J, Janssen WG, Lou W, et al. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *J Neurosci.* 30. 2010. 7507-15.
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004. (11): 839-48.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:911-22.
- Emmanuel Y, Cochlin LE, Tyler DJ, de Jager CA, Smith AD, Clarke K. Human hippocampal energy metabolism is impaired during cognitive activity in a lipid infusion model of insulin resistance. *Brain Behav.* 2013; 32:134-44.
- Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 1999; 66-70.
- Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature.* 2010. 223-31.
- Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced

- insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 77-8:1040-52.
- Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, et al. Obesity and Hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*. 2008; 149: 2628-2636
- Feldman H, Levy AR, Hsiung GY, Peters KR, Donald A, Black SE, et al. A Canadian cohort study of cognitive impairment and related dementias ACCORD: study methods and ine results. *Neuroepidemiology*. 2003. 265-74.
- Ferrer I, Gullotta F. Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol*. 1990; 796:680-5.
- Fifre A, Sponne I, Koziel V, Kriem B, Yen Potin FT, Bihain BE, et al. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J Biol Chem* 2006;2811:229-40.
- Freeman LR GA. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 324:643-53.
- Freeman LR, Granholm AC. Vascular changes in rat hippocampus following a high saturated fat and cholesterol diet. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 32(4):643-53
- Freude S, Plum L, Schnitker J, et al. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes*. 2005; 54: 3343-3348
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395: 763-770
- Frisardi V, Imbimbo BP. Metabolic-Cognitive Syndrome: Metabolic Approach for the Management of Alzheimer's Disease Risk Introduction. *J Alzheimer Dis*. 2010; 30: S1-S4
- Frisardi V, Solfrizzi V, Seripa D, et al. Metabolic-cognitive syndrome: A cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2012; 9: 399-417
- Fritsche LI, Weigert C, Häring HU, Lehmann R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Curr Med Chem*. 2008;15(13):1316-29.
- Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1999. 893:290-3.
- Gerges NZ, Aleisa AM, Alkadhi KA. Impaired long-term potentiation in obese Zucker rats: Possible involvement of presynaptic mechanism. *Neuroscience*. 2003; 120: 535-539
- Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the Brain: Sources, Localization and Functions. *Mol Neurob*. 2013; 47: 145-171
- Giammanco A, Cefalù AB, Noto D, Averna MR. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol*. 2015. 20;6:61.
- Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012. 635-45.
- Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane Fatty Acid Transporters as Regulators of Lipid Metabolism: Implications for Metabolic Disease. *Physiol Rev*. 2010 90 (1) 367-417
- Gleason CE1, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2007 282(14):10341-51.

- Gnaedinger JM, Miller JC, Latker CH, Rapoport SI. Cerebral metabolism of plasma [¹⁴C]palmitate in awake, adult rat: subcellular localization. *Neurochem Res.* 1988; 131:21-9.
- Gold SM DI, Sweat V, Tirsi A, Rogers K, Bruehl H, Tsui W, Richardson S, Javier E, Convit A. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 504:711-9.
- Goldberg I, Robert HE, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res.* 2009. 50. S86–S90.
- Goldman WP, Baty JD, Buckles VD, Sahrman S, Morris JC. Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs. *Neurology.* 1999; 535:956-62.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes.* 54. 2005. 311-21.
- Gorgani-Firuzjaee S, Ahmadi S, Meshkani R. Palmitate induces SHIP2 expression via the ceramide-mediated activation of NF- κ B, and JNK in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 18; 450 :494-9
- Granhölm A-C, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J Alzheimer Dis.* 2008; 14: 133-145
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.* 29. 2009. 12764-7.
- Gregg EW, Yaffe K, Cauley JA, et al. Is diabetes associated with cognitive impairment and cognitive decline among older women? *Arch Intern Med.* 2000; 160: 174-180
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999; 486:1270-4.
- Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 2009; 1296: 35-45
- Grodstein F, Wilson RS, Chen J, Manson JE. Type 2 diabetes and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Diabetes Care.* 2001; 24: 1060-1065
- Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem.* 2007. 101(3):757-70.
- Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, et al. Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol.* 2004. 59-66.
- Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia.* 2003; 4611:1532-42.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005. 99-109.
- Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K,

- Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 2003; 163(13):1524-8.
- Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med*. 2003; 163: 1524-1528
- Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 26(4):193-200.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 2008. 214-226
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci*. 2000; 36:533-5.
- Hallschmid. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int J Obes*. 2007; 32: 275-278
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010. 505-13.
- Hamilton JA, Brunaldi K. A model for fatty acid transport into the brain. *J Mol Neurosci*. 33. 2007. 12-7.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*. 166. : The Rockefeller University Press; 2004. 213-23.
- Havrankova J, Roth J. Insulin receptors are widely distributed in central nervous-system of rat. *Nature*. 1978; 272: 827-829
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 60. 2003. 1119-22.
- Henneberg N, Hoyer S. Desensitization of the neuronal insulin-receptor – A new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer-type (SDAT). *Arch Gerontol Geriatr*. 1995; 21: 63-74
- Heras-Sandoval D, Ferrera P, Arias C. Amyloid-beta protein modulates insulin signaling in presynaptic terminals. *Neurochem Res* 2012; 37(9):1879-85.
- Herschkovitz A, Liu YF, Ilan E, Ronen D, Boura-Halfon S, Zick Y. Common inhibitory serine sites phosphorylated by IRS-1 kinases, triggered by insulin and inducers of insulin resistance. *J Biol Chem*. 282. 2007. 18018-27.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 420. 2002. 333-6.
- Hoehn KL, Hohnen-Behrens C, Cederberg A, Wu LE, Turner N, Yuasa T, et al. IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab*. 7. 2008. 421-33.
- Hori K, Yasuda H, Konno D, Maruoka H, Tsumoto T, Sobue K. NMDA receptor-dependent synaptic translocation of insulin receptor substrate p53 via protein kinase C signaling. *J Neurosci*. 25. 2005. 2670-81.
- Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, Pirttila T, Popescu BO, Rektorova I, et al. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 17. : 2010 The Authors. *European Journal of Neurology* 2010. 1236-48.

- Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006; 23: 3375-3384
- Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: Therapeutic implications. In: Vecsei L, ed. *Frontiers in Clinical Neuroscience: Neurodegeneration and Neuroprotection: A Symposium in Abel Lajtha's Honour*, 2004:135-152
- Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm.* 1998; 105: 415-422
- Hresko RC, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 280. 2005. 40406-16.
- Hu B, Nikolakopoulou AM, Cohen-Cory S. BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development.* 132. 2005. 4285-98.
- Huang TJ, Verkhatsky A, Fernyhough P. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 28: 42-54
- Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis.* 2000. 148(1):1-15.
- Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014. 25(3):200-6.
- Huttmann K, Sadgrove M, Wallraff A, Hinterkeuser S, Kirchhoff F, Steinhauser C, et al. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci.* 18. 2003. 2769-78.
- Inoue M, Yano M, Yamakado M, Maehata E, Suzuki S. Relationship between the adiponectin-leptin ratio and parameters of insulin resistance in subjects without hyperglycemia. *Metabolism.* 55. 2006. 1248-54.
- Ivy AS, Rex CS, Chen Y, Dube C, Maras PM, Grigoriadis DE, et al. Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J Neurosci.* 30. 2010. 13005-15.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist.* 2003; 91:10-22.
- Julien C, Tremblay C, Phivilay A, et al. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging.* 2010; 31: 1516-1531
- Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav* 2009; 96:1-5.
- Kalmijn S, Foley D, White L, et al. Metabolic cardiovascular syndrome and risk of dementia in Japanese-American elderly men - The Honolulu-Asia Aging Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2255-2260
- Karmi A, Iozzo P, Viljanen A, Hirvonen J, Fielding BA, et al. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes.* 2010. 2171-7.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 2010. 121-9.
- Ke YD, Delerue F, Gladbach A, Götz J, Ittner LM. Experimental diabetes mellitus exacerbates tau pathology in a transgenic

- mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2009. 19;4(11):e7917
- Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology*. 2001. 74(4):270-80.
- Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 146. 2005. 1473-81.
- Kien CL, Bunn JY, Ugrasbul F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr*. 2005. 82 2 320-326
- Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2009 150(12):5294-301
- Kim J, Park YJ, Jang Y, Kwon YH. AMPK activation inhibits apoptosis and tau hyperphosphorylation mediated by palmitate in SH-SY5Y cells. *Brain Res*. 1418. : 2011. 42-51.
- Kimes AS, Sweeney D, London ED, Rapoport SI. Palmitate incorporation into different brain regions in the awake rat. *Brain Res*. 274. 1983. 291-301.
- Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, et al. Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 1996; 74:177-81.
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, et al. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2005; 62: 1556-1560
- Klein S, Burke LE, Bray GA, et al. Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease - A statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism - Endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation*. 2004; 110: 2952-2967
- Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. 1990; 133:228-43.
- Knobloch M, Mansuy IM. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2008; 371:73-82.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416. 1997. 15-8.
- Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem*. 280. 2005. 33588-98.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*. 7. 2008. 45-56.
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, et al. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat fed rats. *Diabetes*. 1991; 40: 1397-1403
- Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med*. 2011 3(12):742-54

- Lambert KG, Buckelew SK, Staffiso-Sandoz G, Gaffga S, et al. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. *Physiol Behav.* 1998. 65:43-9.
- Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, et al. Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol.* 2008. 20(10):1176-90
- Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci.* 1998; 112: 1199-1208
- Laron Z. Insulin--a growth hormone. *Arch Physiol Biochem.* 114. 2008. 11-6.
- Larqué C, Velasco M, Navarro-Tableros V, Duhne M, Aguirre J, Gutiérrez-Reyes G, Moreno J, Robles-Diaz G, Hong E, Hiriart M. Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life.* 2011. 63(10):831-9.
- Lasselin J, Capuron L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation.* 2014. 95-101.
- Laura B. Buckmana AHH, David K. Flahertyb, Christopher T. Buckmanc, Misty M. Thompsona, Brittany Matlockb, Kevin Wellerb, Kate L.J. Ellacott. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun* 2013.
- Lee JY, Cho HK, Kwon YH. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism.* 59. 2010. 927-34.
- Levin-Allerhand JA, Smith JD. Ovariectomy of young mutant amyloid precursor protein transgenic mice leads to increased mortality. *J Mol Neurosci.* 2002; 19: 163-166
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem.* 89. 2004. 1092-100.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006. 787-95.
- Lind L, H. Hypertension, hyperlipidemia, insulin resistance and obesity: Parts of a metabolic syndrome. *Blood Press Supp* 1992; 4:49-54.
- Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Europ J Neurol* 2006; 1312:1385-8.
- Liu SS. Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain--superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 1999; 314:367-76.
- Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol.* 2011; 225: 54-62
- López S, Bermúdez B, Abia R, Muriana FJ. The influence of major dietary fatty acids on insulin secretion and action. *Curr Opin Lipidol.* 2010. 21(1):15-20.
- Lovejoy J, Smith S, Champagne C, Most M, Lefevre M, et al. Effects of Diets Enriched in Saturated (Palmitic), Monounsaturated (Oleic), ortrans (Elaidic) Fatty Acids on Insulin Sensitivity and Substrate Oxidation in Healthy Adults. *Diabetes Care.* 2002 25 8 1283-1288

- Lugert S, Basak O, Knuckles P et al. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*. 2010 6:445-56.
- Luo M, Reyna S, Wang L, Yi Z, Carroll C, Dong LQ, et al. Identification of insulin receptor substrate 1 serine/threonine phosphorylation sites using mass spectrometry analysis: regulatory role of serine 1223. *Endocrinology*. 146. 2005. 4410-6.
- Luque-Contreras D, Carvajal K, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Campos-Peña V. . Oxidative stress and metabolic syndrome: Cause or consequence of Alzheimer's disease? *Oxid Med Cell Longev*. 2014 497802.
- Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 26;97(20):11056-61.
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*. 276. 2001. 21938-42.
- Margolis R, Altzuler A. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature*. 1967; 215: 1375-1376
- Mariani E, Monastero R, Mecocci. Mild cognitive impairment: a systematic review. *J Alzheimers Dis*. 2007; 121:23-35.
- Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci*. 2009. 20;29(20):6734-51
- Martin ED, Sanchez-Perez A, Luis Trejo J, et al. IRS-2 Deficiency Impairs NMDA Receptor-Dependent Long-term Potentiation. *Cereb Cortex*. 2011; 22: 1717-1727
- Mashek DG, Coleman RA. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 17. 2006. 274-8.
- Masliah E, Heaton RK, Marcotte TD, Ellis RJ, Wiley CA, Mallory M, et al. Dendritic injury is a pathological substrate for human immunodeficiency virus-related cognitive disorders. HNRC Group The HIV Neurobehavioral Research Center. *Ann Neurol*. 1997; 426:963-72.
- Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab*. 15. 2012 Inc; 2012. 38-50.
- Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, et al. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease The Hisayama Study. *Neurology*. 2010; 75: 764-770
- May JM, de Haen C. Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. *J Biol Chem*. 1979; 254:2214-20.
- Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 151. 2010. 576-85.
- McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system:

- relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* 2004. 19;490:13-24.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011. 263-9.
- McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 93: 546-553
- Mei Z, Grummer-Strawn LM, Pietrobelli A, Goulding A, Goran MI, Dietz WH. Validity of body mass index compared with other body-composition screening indexes for the assessment of body fatness in children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2002; 56:978-85.
- Meigs JB. Invited commentary: Insulin resistance syndrome? Syndrome x? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am J Epidemiol* 2000; 15210:908-11.
- Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Arias C. Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid- β toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013. 842-8.
- Mercado-Gomez O; Villavicencio-Queijeiro, A; Massieu, L; Chimal-Monroy, J; Arias, C. Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates gsk-3 beta activity and induces morphological changes in cortical neurons: Role of tau phosphorylation. *Neurochem Res* 2008; 338:1599-609.
- Milligan G, Ulven T, Murdoch H, Hudson BD. G-protein-coupled receptors for free fatty acids: nutritional and therapeutic targets. *Br J Nutr.* 111 Suppl 1. 2014. S3-7.
- Mitchell RW, On NH, Del Bigio MR, Miller DW, Hatch GM. Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem.* 2011; 1174:735-46.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging.* 2010; 31: 224-243
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gomez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience.* 2002; 112: 803-814
- Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: Protection by antioxidants. *Exp Neurol.* 2006; 200: 496-508
- Moreira PI, Duarte AI, Santos MS, Rego AC, Oliveira CR. An Integrative View of the Role of Oxidative Stress, Mitochondria and Insulin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis.* 2009; 16: 741-761
- Morino K, Neschen S, Bilz S, Sono S, Tsigotis D, Reznick RM, et al. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes.* 2008. 2644-51.
- Morris JC, Cummings J. Mild cognitive impairment MCI represents early-stage Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 73:235-9.
- Morris JC, Storandt M, Miller JP, McKeel DW, Price JL, Rubin EH, et al. Mild

- cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2001. 397-405.
- Moser MB, Trommald M, Andersen An. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 9126:12673-5.
- Moser MD, Matsuzaki S, Humphries KM. Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys.* 488. 2009. 69-75.
- Mukherjee SP, Lane RH, Lynn WS. Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents. *Biochem Pharmacol.* 27. 1978. 2589-94.
- Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Moran J, Arias C. beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res.* 68. 2002. 89-96.
- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology.* 145. 2004. 4880-9.
- Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. 2014. Diabetes and the brain: Oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 102-158.
- Musser DA, Oseroff AR. The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with Photofrin II. *Photochem Photobiol.* 1994; 596:621-6.
- Nelson TJ, Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur J Pharmacol.* 585. 2008. 76-87.
- Nishida H, Okabe S. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *J Neurosci.* 27. 2007. 331-40.
- Oh H, Boghossian S, York DA, Park-York M. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Res* 2013; 251301299-7.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, et al. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 2008; 1188:2959-68.
- Palmer K, Musicco M, Caltagirone C. Are guidelines needed for the diagnosis and management of incipient Alzheimer's disease and mild cognitive impairment? *Int J Alzheimers Dis.* 2010.
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* 2000. 68(4):509-14.
- Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett.* 482. 2010. 235-9.
- Patel MI, Gupta A, Dey CS. Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacol Re* 2011; 635:1162-8.
- Patil S, Chan C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like

- hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 384. 2005. 288-93.
- Patil S, Melrose J, Chan C. Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *Eur J Neurosci.* 26. 2007. 2131-41.
- Pavlik V, Massman P, Barber R, Doody R, Tarcc. Differences in the Association of Peripheral Insulin and Cognitive Function in Non-Diabetic Alzheimer's Disease Cases and Normal Controls. *J Alzheimer Dis.* 2013; 34: 449-456
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 94. : 2014 the American Physiological Society. 2014. 1077-98.
- Persiyantseva NA, Storozhevykh TP, Senilova YE, Gorbacheva LR, Pinelis VG, Pomytkin IA. Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *J Mol Signal.* 8. 2013.
- Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, et al. Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci* 2007; 2750:13635-48.
- Plitzko D, Rumpel S, Gottmann K. Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. *Eur J Neurosc.* 2001; 14: 1412-1415
- Plum L, Ma X, Hampel B, Balthasar N, Coppari R, Munzberg H, et al. Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *J Clin Invest.* 2006; 1167:1886-901.
- Pomytkin IA, Kolesova OE. Effect of insulin on the rate of hydrogen peroxide generation in mitochondria. *Bull Exp Biol Med.* 2003; 1356:541-2.
- Pomytkin IA, Kolesova OE. Key role of succinate dehydrogenase in insulin-induced inactivation of protein tyrosine phosphatases. *Bull Exp Biol Med.* 2002; 1336:568-70.
- Popov VI, Bocharova LS. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation. *Neuroscience.* 1992 48:45-51.
- Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res.* 1999; 102: 73-88
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007. 1443-55.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998. 4;273(49):32730-8.
- Radecki DT, Brown LM, Martinez J, Teyler TJ. BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LT Hippocampus. 2005; 152:246-53.
- Raffaitin C, Gin H, Empana JP, et al. Metabolic syndrome and risk of Alzheimer's disease or vascular dementia incident: study within the cohort 3C. *Diabetes Metab.* 2009; 35: A48-A49
- Reagan LP, Rosell DR, Alves SE, Hoskin EK, McCall AL, Charron MJ, et al. GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2002. 129-34.
- Reger MA, Watson GS, Green PS, et al. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired

- older adults. *J Alzheimer Dis.* 2008; 13: 323-331
- Rial E, Rodriguez-Sanchez L, Gallardo-Vara E, Zaragoza P, Moyano E, Gonzalez-Barroso MM. Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function. *Biochim Biophys Acta.* 1797. 2010. 800-6.
- Rizzo B, Zambonin L, Angeloni C, Leoncini E, Dalla Sega FV, Prata C, et al. Steviol glycosides modulate glucose transport in different cell types. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:348169.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996; 97(12):2859-65.
- Rosen OM. Insulin receptor as a tyrosine protein kinase. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 463:13-9.
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capurro V, Vigano D, et al. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus.* 2009; 19(8):763-72.
- Salcedo-Tello P, Hernández-Ortega K, Arias C. Susceptibility to GSK3 β -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition. *J Alzheimers Dis.* 2014. :775-85.
- Sallam HS, Tumurbaatar B, Zhang WR, Tuvdendorj D, et al. Peripheral adipose tissue insulin resistance alters lipid composition and function of hippocampal synapses. *J Neurochem.* 2015. 125-33.
- Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279(31):32345-53
- Samuel VT, Liu ZX, Qu XQ, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004; 279: 32345-32353
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307. 2005. 1098-101.
- Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res.* 1983; 260: 330-333
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 2007; 87: 507-520
- Savary S, Trompier D, Andréoletti P, Le Borgne F, Demarquoy J, Lizard G. Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation. *Curr Drug Metab.* 2012 13(10):1358-70.
- Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L. Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res.* 1996; 736: 16-27
- Schechter, R., Yanovitch, T., Abboud, M., Johnson III, G., Gaskins, J. Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. 1998. *Brain Res.* 808 (2), pp. 270-278.
- R.J Schulingkamp, T.C Pagano, D Hung, R.B Raffa. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. 2000. *Neurosc & Biobehav Rev.* 24, 8 855-872.
- Schmid E, El Benna J, Galter D, Klein G, Droge W. Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB J.* 1998;

1210:863-70.

Schmid E, Hotz-Wagenblatt A, Hacj V, Droge W. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural basis of redox priming. *FASEB J*. 1999; 1312:1491-500.

Schrijvers EMC, Witteman JCM, Sijbrands EJG, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease The Rotterdam Study. *Neurology*. 2010; 75: 1982-1987

Schubert M, Gautam D, Surjo D, Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 2;101(9):3100-5.

Schwingshackl L, Hoffmann G. Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *J Acad Nutr Diet*. 2013 113(12):1640-61.

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*. 1992 Aug;13(3):387-414.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002. 789-91.

Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008. 1370-5.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*. 1998; 336 1:241-6.

Shie FS, Jin LW, David GC, Leverenz JB, LeBoeuf RC. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport*. 2002; 13: 455-459

Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S. Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin signalling through the dentate gyrus. *Behav Brain Res*. 2012; 229: 378-383

Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*. 1953 87:387-406

Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. *Neurobiol Aging*. 2012; 33:

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000; 1062:171-6.

Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2003; 1494:331-5.

Skeberdis VA, Lan JY, Zheng X, Zukin RS, Bennett MVL. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 986:3561-6.

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*. 1963; 77:383-93.

Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 1991. 294:158-62.

Small DH. Mechanisms of synaptic

- homeostasis in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2004; 11:27-32.
- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11. 2005. 400-7.
- Soliman GA. The integral role of mTOR in lipid metabolism. *Cell Cycle.* 10. 2011. 861-2.
- Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 24. 2010. 2596-611.
- Sonksen P, Sonksen J. Insulin: understanding its action in health and disease. *Br J Anaesth.* 2000; 85:69-79.
- Steinberg GR, Kemp BE, Watt MJ. Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007. 958-64.
- Storozhevskiy TP, Senilova YE, Persiyantseva NA, Pinelis VG, Pomytkin IA. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci.* 8. 2007. 84.
- Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci.* 2008; 11: 309-317
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, et al. Diet-Induced Insulin Resistance Impairs Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognition in Middle-Aged Rats. *Hippocampus.* 2008; 18: 1085-1088
- Studzinski CM, Li F, Bruce-Keller AJ, et al. Effects of short-term Western diet on cerebral oxidative stress and diabetes related factors in APP x PS1 knock-in mice. *J Neurochem.* 2009; 108: 860-866
- Sui L, Wang J, Li B-M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem.* 2008; 15: 762-776
- Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int.* 2002. 441-8.
- Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, et al. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A beta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 7036-7041
- Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest.* 2012; 122: 1316-1338
- Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates IRS serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 9. 2009. 753-62.
- Titus AD, Shankaranarayana Rao BS, Harsha HN, Ramkumar K, Srikumar BN, Singh SB, et al. Hypobaric hypoxia-induced dendritic atrophy of hippocampal neurons is associated with cognitive impairment in adult rats. *Neuroscience.* 145. 2007. 265-78.
- Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104. 2007. 14056-61.
- Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs

- cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci.* 20. 2000. 8972-9.
- Turner N, Heilbronn LK. Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol Metab.* 19. 2008. 324-30.
- Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem.* 2002; 95:224-37.
- Umegaki H. Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing.* 2010; 39: 8-10
- Valenciano AI, Corrochano S, de Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J Neurochem.* 2006. 99:524-36
- Valladolid-Acebes I, Merino B, Principato A, et al. High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302: E396-E402
- van den Berg E, Biessels GJ, de Craen AJM, Gussekloo J, Westendorp RGJ. The metabolic syndrome is associated with decelerated cognitive decline in the oldest old. *Neurology.* 2007; 69: 979-985
- van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispén WH, Ramakers GMJ. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem.* 2005; 94: 1158-1166
- van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF, Hasselbaink DM, Luiken JJ. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol Cell Biochem.* 2002; 239:1-2:9-15.
- van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav.* 2008. 231-41.
- Viscogliosi G, Andreozzi P, Chiriac IM, et al. Screening Cognition in the Elderly with Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2012; 10: 358-362
- Wan Q, Xiong ZG, Man YH, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, et al. Recruitment of functional GABAA receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 1997; 388:643:686-90.
- Wang JL, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng ZH, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes.* 2001; 50: 2786-2791
- Weigert C, Kron M, Kalbacher H, et al. Interplay and effects of temporal changes in the phosphorylation state of serine-302, -307, and -318 of insulin receptor substrate-1 on insulin action in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 22. 2008. 2729-40.
- Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, et al. Localization and characterization of insulin-receptors in rat-brain and pituitary-gland using invitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology.* 1987; 121: 1562-1570
- White B. Dietary Fatty Acids. *Am Fam Physician.* 2009. 15;80(4):345-350.
- White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, et al. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell.* 54. 1988. 641-9.
- White MF. IRS proteins and the common

- path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002. 283(3):E413-422.
- Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Br Med J*. 2005; 330: 1360-1362B
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, et al. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*. 24. 2004. 5016-21.
- Williams PG. Nutritional composition of red meat, *Nutrition & Dietetics*, 2007. 64 S113-S119.
- Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, et al. Memory impairment in obese Zucker rats: An investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci*. 2005; 119: 1389-1395
- Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*. 2003; 9: 795-800
- Wu AG, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004; 19: 1699-1707
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci*. 2002; 22:
- Xu W, Caracciolo B, Wang H-X, et al. Accelerated Progression From Mild Cognitive Impairment to Dementia in People With Diabetes. *Diabetes*. 2010; 59: 2928-2935
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 293. 2001. 1673-7.
- Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*. 109. 2007. 3509-12.
- Zhang G, Neubert TA, Jordan BA. RNA binding proteins accumulate at the postsynaptic density with synaptic activity. *J Neurosci*. 32. 2012. 599-609.
- Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature*. 1994; 372: 425-432
- Zhao L, Kang I, Fang X, Wang W, Lee MA, Hollins RR, et al. Gamma-tocotrienol attenuates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting adipose inflammation and M1 macrophage recruitment. *Int J Obes Lond*. 39. 2015. 438-46.
- Zhao WQ, Chen H, Xu H, et al. Brain insulin receptors and spatial memory - Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem*. 1999; 274: 34893-34902
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 44. 2004. 749-57.
- Zick Y. Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 32. 2004. 812-6.