



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“EFECTO DEL CONSUMO DE DIETA ALTA EN GRASA Y FRUCTOSA SOBRE LA CONDUCTA Y
SU RELACIÓN CON CAMBIOS OXIDATIVOS EN REGIONES LÍMBICAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. DAVID ALEJANDRO OLIVAS CHAIREZ

Tutores principales:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Instituto de neurobiología, UNAM

Dr. Luis Antonio Reyes Castro (INCMNSZ)

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Comité tutor:

Dra. Claudia Cecilia Vega García

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Martha Silvia Solís Ortiz

Departamento de Ciencias Médicas, UG

SANTIAGO DE QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos Institucionales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de beca No. 1083085 para la realización de la Maestría en Ciencias (Neurobiología).

A la Dirección general de orientación y atención educativa (DGOAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca Tablet conectividad 2021, folio: 59-01916, otorgada durante la realización del proyecto que me permitió asistir a mis clases de forma virtual.

Al apoyo eficiente de la Dra. Nuri Aranda López, Coordinación del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Al personal del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ): M.V.Z. Mariela G. Contreras Escamilla, M.V.Z. Jovani Zamudio López, T.L. Gimena Juárez Pilares. Y al Departamento de Biología de la Reproducción de INCMNSZ.

Agradecimientos personales

A la Dra. Yolanda Diaz quien, a pesar de haber aparecido sin previo aviso, desde un lugar lejano, me brindo todo su apoyo y confianza para la elaboración del presente proyecto, guiandome por el camino y dirigiendo me con las personas adecuadas.

Al Dr. Luis Reyes por recibirme con las puertas abiertas, su entusiasmo, su dedicación y gran confianza en mis capacidades en cada paso del camino.

A la Dra. Claudia Vega por todo su apoyo en la parte metodológica del procesamiento del estrés oxidante del tejido cerebral, así como su respectivo análisis.

A Edgar Alva por su gran amistad y su apoyo en la realización de las pruebas conductuales, así como su incalculable paciencia para aguantarme cuando comenzaba a decir incoherencias durante nuestras largas jornadas.

A Gimena Juárez por su amistad, su apoyo en el bioterio durante el tiempo que no estuve y las charlas de desahogo ocasionales a pesar de que estábamos siempre atareados.

A mis compañeros del laboratorio en Biología de la Reproducción: Edgar Méndez, Vanesa Gutiérrez, Bismark Vázquez, Mitzi Olivares, Dayan Méndez, Rafael Vargas y Ana Gómez por su amistad, el apoyo mutuo que nos brindamos y los buenos momentos que compartimos.

A las Dra. Consuelo Lomas por su ayuda en toda la parte de PCR-TC, su apoyo en sanar los “traumas del pasado” y por permitirme darle su dosis diaria de drama.

A la Dra. Catalina Castro por su ayuda incondicional a pesar de no ser alumno suyo, sus abrazos y sus ocasiones muestras culinarias de su natal Colombia.

A mis compañeros del laboratorio C-02 del INB en especial al Dr. Humberto Martínez, la Dra. Erika Orta, el Dr. Isaac Vargas y el Dr. Alexander González, que a pesar de no haber convivido mucho con ustedes los aprecio.

A mis amigos de Durango que siempre se preocuparon por mi especialmente a Edna lozano, Jennifer Gandarilla, Alejandro Pérez, Zoé Flores, Adrián Hernández, Saín Covarrubias, Elizabeth Ramos y Carlos Flores.

Al Mtro. Rodrigo García por su ayuda en los momentos más difíciles cuando todo parecía oscuro y sin sentido.

A mi familia por su apoyo y comprensión durante todo el camino de esta larga travesía.

Y finalmente, pero no menos importante, a los animales de experimentación que dieron su vida en pro de aportar nuevo conocimiento a la ciencia. *Requiescat in pace.*

Resumen

INTRODUCCIÓN: La prevalencia de la obesidad infantil ha aumentado más del doble en menos de 20 años. Se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa (DAGAF) está vinculada con la obesidad, así como a alteraciones cognitivas. Asimismo, la ingesta de DAGAF se ha asociado con aumento de estrés oxidante (EO) en estructuras cerebrales.

OBJETIVO: Estudiar los efectos del consumo de una DAGAF sobre la memoria de reconocimiento (MR) en la rata macho, y su asociación con el EO.

HIPÓTESIS: La DAGAF incrementará el EO y generará cambios en la expresión génica de las enzimas antioxidantes en el cerebro, que modificará la MR en la rata macho.

MÉTODOS: Se emplearon ratas Wistar de 21 días de edad, divididas en dos grupos (n=10) los cuales fueron alimentados con DAGAF o dieta control (DC), durante 20 semanas. Se evaluaron la ingesta de alimentos, la composición corporal mediante resonancia magnética (tejido adiposo y magro) y la MR a corto plazo (2 h), largo plazo temprano (24 h) y largo plazo tardío (7 d), mediante prueba conjunta de reconocimiento de objeto novedoso y nueva localización de objeto (RON/RNL), posterior a esto se les dio eutanasia recolectándose suero, hipocampo y corteza prefrontal (CPF). En suero se determinaron sustancias reactivas a ácido tibarbitúrico (TBARS), hormona adenocotico rópica (ACTH) y corticosterona. Una porción de hipocampo y CPF se utilizó para medir especies reactivas de oxígeno (ERO), TBARS y actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), glutation peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT). La otra porción de tejido se empleó para determinar la expresión génica de SOD-1, Gpx-4, CAT y el receptor de glucocorticoides (RG), por PCR en tiempo real.

RESULTADOS: Las ratas DAGAF presentaron aumento de peso y tejido graso, y disminución del tejido magro. En cuanto a la ingesta alimenticia, las ratas DAGAF consumieron menos alimento con respecto a DC. En la evaluación de MR se observó una disminución en los índices de discriminación y reconocimiento en todos los tiempos evaluados con respecto a DC. En suero se presentaron mayores concentraciones de ACTH, corticosterona y TBARS al comparar con DC. Las concentraciones de TBARS y ERO en hipocampo y CPF fueron mayores que en el grupo DC. Incrementó la actividad enzimática de SOD y GPx en las regiones cerebrales analizadas, mientras que CAT solo aumentó en CPF con respecto a DC. Finalmente, en hipocampo existió un aumento en la expresión génica de SOD-1, CAT y el RG, mientras que en CPF incrementó la expresión de CAT y disminuyó la de SOD-1 y GPx-1 con respecto a DC.

CONCLUSIÓN: El consumo crónico de DAGAF desde una etapa temprana del desarrollo disminuye la MR, debido a un incremento en los marcadores de EO, en la concentración de ACTH y corticosterona y una modificación en las enzimas antioxidantes.

Abstract

INTRODUCTION: The prevalence of childhood obesity has more than doubled in less than 20 years. Consumption of a high-fat, high-fructose diet (HFHFD) has been shown to be linked to obesity, as well as cognitive impairment. Likewise, the intake of HFHFD has been associated with an increase in oxidative stress (OS) in brain structures.

OBJECTIVE: To study the effects of consuming a HFHFD on recognition memory (RM) in male rats, and its association with OS.

HYPOTHESIS: HFHFD will increase OS and generate changes in the genetic expression of antioxidant enzymes in the brain, which will modify the RM in the male rat.

METHODS: Wistar rats of 21 days of age were used, divided into two groups (n=10) which were fed with HFHFD or control diet (CD), for 20 weeks. Food intake, body composition by magnetic resonance imaging (adipose and lean tissue), and RM were assessed by joint test of novel object recognition and new object localization (NOR/NLR), determining short-term (2 h), early long-term (24 h), and late long-term (7 d), after which they were euthanized, collecting serum, hippocampus, and prefrontal cortex (PFC). In serum, substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), adenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone were determined. A slice of hippocampus and PFC was used to measure reactive oxygen species (ROS), TBARS, and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) enzyme activity. The other portion of tissue was used to determine the gene expression of SOD-1, Gpx-4, CAT and the glucocorticoid receptor (GR), by real-time PCR.

RESULTS: HFHFD rats presented increased weight and fatty tissue and decreased lean tissue. Regarding food intake, HFHFD rats consumed less food with respect to CD. In the evaluation of RM, a decrease in the discrimination and recognition indices was observed at all times evaluated with respect to CD. In serum, there were higher concentrations of ACTH, corticosterone and TBARS when compared with CD. The concentrations of TBARS and ROS in the hippocampus and PFC were higher than in the CD group. It increased the enzymatic activity of SOD and GPx in the analyzed brain regions, while CAT only increased in PFC with respect to CD. Finally, in the hippocampus there was an increase in the genetic expression of SOD-1, CAT and GR, while in PFC the expression of CAT increased and that of SOD-1 and GPx-1 decreased with respect to CD.

CONCLUSION: Chronic consumption of HFHFD from an early stage of development decreases RM, due to an increase in OS markers, ACTH and corticosterone concentration, and a modification in antioxidant enzymes.

Abreviaturas

11βHSD1	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1	MCP	Memoria a corto plazo
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MLP	Memoria a largo plazo temprano
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	MLPT	Memoria a largo plazo tardío
ACTH	Hormona adenocorticotrópica	MR	Memoria de reconocimiento
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados	MRe	Medio de reacción
ASB	Albumina de suero bovino	MDA	Malondialdehído
ATB	Ácido tiobarbitúrico	μl	microlitros
ATC	Ácido tricloroacético	min	minutos
ATP	Adenosina trifosfato	mg	miligramos
AU	Ácido úrico	ml	mililitros
BHE	Barrera hematoencefálica	MetOH	Metanol
BHT	Butilhidroxitolueno	NF-κB	Factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de células B activadas
CA	Cornus ammonis	NO\cdot	Óxido nítrico
CAT	Catalasa	Nrf2	Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2
CPF	Corteza prefrontal	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CO	Cuadrante objetivo	NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
d	días	N-Tyr	Nitrotirosina
DC	Dieta control	ng	nanogramos
DAGAF	Dieta anta en grasa alta en fructosa	nm	nanómetros
DCF	2',7'-diclorofluoresceína	nmol	nabomoles
DCFH	2,7-diclorodihidrofluorosceína	O₂	Oxígeno molecular
DCF-DA	2,7-diclorofluorosceína diacetato	O₂\cdot^-	Anión superóxido
EE	Error estándar	OH\cdot	Radical hidroxilo
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	OID	Obesidad inducida por dieta
EO	Estrés oxidante	ONOO\cdot^-	Peroxinitrito
ERN	Especies reactivas de nitrógeno	PFGA	Productos finales de la glicación avanzada
ERO	Especies reactivas de oxígeno	pg	picogramos
EP	Evitación pasiva	PGC-1 α	Coactivador γ del receptor activado por el proliferador e peroxisomas
g	gramos	s	segundos
GPx	Glutación peroxidasa	SOD	Superóxido dismutasa
GR	Glutación reductasa	PPARα	Receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas
h	horas	RG	Receptor de glucocorticoides
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	RM	Resonancia magnética
HCl	Ácido clorhídrico	RNL	Reconocimiento de nueva localización de objeto
HEPES	Ácido 4-(2hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico	RON	Reconocimiento de objeto novedoso
HHA	Hipotálamo-hipófisis-adrenal	rpm	revoluciones por minuto
IA	índice de adiposidad	sem	semanas
ID	Índice de discriminación	TBARS	Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico
IMC	Índice de masa corporal	TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	UCP2	Proteína de desacoplamiento mitocondrial 2
INT	Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tretazolio	XOD	Xantina oxidasa
IR	Índice de reconocimiento		
kcal	Kilocalorías		
Kg	Kilogramos		
KPBS	Amortiguador de fosfato potásico		
LAM	Laberinto acuático de Morris		
LEY	Laberinto en Y		
LPO	Lipoperoxidación		

Índice

Agradecimientos Institucionales	I
Agradecimientos personales	II
Resumen	III
Abstract	IV
Abreviaturas	V
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 La obesidad como problema del siglo XXI	2
2.2 Obesidad: causas y consecuencias a la salud	3
2.3 Alteraciones cognitivas inducidas por la obesidad y la dieta	4
2.4 Desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	5
2.5 Modelos animales de obesidad	6
2.6 Memoria de reconocimiento en roedores y sustrato neuroanatómico.	7
2.7 Evaluación de la memoria de reconocimiento en roedores	9
2.8 Estrés oxidante inducido por dieta obesogénica	12
2.9 Peroxidación lipídica	13
2.10 Defensa antioxidante del organismo	14
2.11 Vulnerabilidad del parénquima cerebral al estrés oxidante	15
3. Justificación	19
4. Pregunta de investigación.....	19
5. Hipótesis	19
6. Objetivos.....	20
6.1 General	20
6.2 Específicos.....	20
7. Metodología.....	20
7.1 Animales experimentales	20
7.2 Consideraciones éticas	21
7.3 Dietas experimentales.....	21
7.4 Medición de peso corporal e ingesta.....	22

7.5	Evaluación de memoria de reconocimiento.....	22
7.6	Evaluación de la composición corporal	25
7.7	Eutanasia y disección de cerebro	25
7.8	Determinación de corticosterona.....	26
7.9	Determinación de ACTH	27
7.10	Biomarcadores de estrés oxidante.....	28
7.10.1	Cuantificación de proteína por método de Bradford	28
7.10.2	Lipoperoxidación por TBARS	29
7.10.3	Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	30
7.10.4	Superóxido dismutasa (SOD).....	32
7.10.5	Glutación peroxidasa (GPx)	33
7.10.6	Catalasa (CAT).....	34
7.11	Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)	35
8.	Análisis estadístico	36
9.	Resultados.....	37
9.1	Ganancia de peso	37
9.2	Ingesta de alimento y calórica.....	37
9.3	Evaluación de memoria.....	39
9.4	Composición corporal por resonancia magnética (RM).....	43
9.5	Peso corporal, grasa total e índice de adiposidad.....	44
9.6	ACTH y corticosterona	46
9.7	Biomacadores de estrés oxidante	47
9.7.1	Concentración de TBARS en suero.....	47
9.7.2	TBARS en hipocampo y corteza prefrontal (CPF)	47
9.7.3	Especies reactivas de oxígeno en hipocampo y CPF	48
9.7.4	Enzimas antioxidantes hipocampo	49
9.7.5	Enzimas antioxidantes CPF	50
9.8	Expresión génica.....	51
9.8.1	Expresión génica hipocampo.....	51
9.8.2	Expresión génica CPF	52
9.9	Correlaciones	53
10.	Discusión	56

11.	Resumen de resultados.....	64
12.	Conclusiones.....	66
13.	Perspectivas futuras.....	66
13.	Referencias.....	67
14.	Anexos.....	91
I.	Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....	91
II.	Determinación de TBARS.....	93
III.	Determinación de ERO.....	95
IV.	Medición de actividad de la SOD.....	98
V.	Medición de actividad de la GPx.....	101
VI.	Medición de actividad de la CAT.....	103
VII.	Expresión génica.....	105

1. Introducción

La obesidad se ha convertido en un problema a nivel mundial, debido a su etiología multifactorial (WHO, 2021). El consumo de alimentos ricos en grasa y su combinación con azúcares ha contribuido en gran medida a aumentar su prevalencia (Corsica & Hood, 2011; Martin & Davidson, 2014), especialmente en la población infantil (dos Santos *et al.*, 2020).

El consumo de este tipo de dietas se relaciona con el riesgo de producir complicaciones cardiovasculares, resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Choi *et al.*, 2020; García-Galbis *et al.*, 2021; Schmitz *et al.*, 2021), así como a alteraciones cognitivas (Lin *et al.*, 2017; Loprinzi & Frith, 2018; Zanini *et al.*, 2017), las cuales pueden ocurrir durante el desarrollo de las estructuras cerebrales en donde se integra la memoria, como son la formación hipocampal y la corteza (Liśkiewicz *et al.*, 2021). Las causas que la provocan son diversas entre estas: mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Bonomini *et al.*, 2015; Tam *et al.*, 2020), aumento en las citocinas proinflamatorias (Frasca *et al.*, 2017; Tam *et al.*, 2020; Trim *et al.*, 2018), o alteración de la barrera hematoencefálica (Lin *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta la fecha el mecanismo causal sigue siendo incierto.

Los estudios a nivel experimental en modelos murinos han reportado una disminución de la memoria de reconocimiento (MR), dependiente del hipocampo y la corteza prefrontal (CPF), ocasionado por una dieta alta en grasa y fructosa (DAGAF) (Anderson *et al.*, 2013; Gancheva & Zhelyazkova-Savova, 2020; Kalivarathan *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Mamo *et al.*, 2019; Martínez-Orozco *et al.*, 2021; Mulati *et al.* 2020; Wang *et al.*, 2019). A la par de estas observaciones, se ha informado incremento del estrés oxidante (EO) en dichas estructuras (Batandier *et al.*, 2020; Crescenzo *et al.*, 2019; Kalivarathan *et al.*, 2017; Labban *et al.*, 2020).

A pesar de lo mencionado, se ha abordado poco sobre los efectos de una DAGAF sobre la memoria durante etapas tempranas del desarrollo posnatal asociada al desequilibrio del estado *redox*, a favor de lo pro-oxidante, en las estructuras neuroanatómicas que la sustentan. Debido a esto, es de suma importancia estudiar esta relación a mayor profundidad, con la finalidad de explorar

los posibles mecanismos implicados en dichas alteraciones. Por lo que, en el presente trabajo, se propone el estudio en un modelo murino, de los efectos del aumento del EO por el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa y su repercusión en la memoria.

2. Antecedentes

2.1 La obesidad como problema del siglo XXI

En México, de acuerdo con la última edición de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2018-19) la prevalencia de obesidad en los grupos etarios: de 5-11 años, 12-19 años y mayores de 20 años fue de 17.5%, 14.6% y 35.3% respectivamente (Shamah *et al.*, 2020). Además a nivel mundial, la obesidad en niños de 5-19 años sufrió un aumento en su prevalencia del 2.9% al 6.8% entre el 2000 y el 2016 (Bentham *et al.*, 2017), es decir, más del doble en menos de 20 años. La importancia de dicho aumento en la población infantil, radica en el hecho de que los niños y adolescentes con obesidad son propensos a seguir siéndolo en la etapa adulta (Freedman *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2011; Liśkiewicz *et al.*, 2021; Marseglia *et al.*, 2015), por lo que la infancia es un periodo crítico para el establecimiento de trayectorias de peso de por vida (dos Santos *et al.*, 2020; Gardner *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2011). Por lo tanto, existe un mayor riesgo de enfermedad a medida que van creciendo (Marseglia *et al.*, 2015), llevando a la aparición de múltiples comorbilidades relacionadas con la obesidad (Liśkiewicz *et al.*, 2021).

En los últimos 40 años, la dieta mexicana ha pasado de alimentos frescos y no procesados, a productos ultraprocesados con alto contenido de azúcar, sal y grasa (Barquera & Rivera, 2020). Paralelamente con estos cambios en la dieta, se ha observado incremento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad (Rivera *et al.*, 2004), inducida por la alta ingesta dietética de grasas y azúcares que se ha considerado una de las principales causas de obesidad (Conlon *et al.*, 2013; Gomez-Pinilla *et al.*, 2021; Shamah *et al.*, 2020). Uno de los azúcares más empleados es la fructosa, con el objetivo de mejorar la palatabilidad de los alimentos, especialmente en bebidas endulzadas y alimentos procesados (Payant & Chee, 2021).

Si bien, el gobierno de México ha implementado intensas campañas y medidas para disminuir el consumo de este tipo de alimentos, esto no ha sido suficiente y la prevalencia de obesidad en nuestro país sigue en aumento. La falta de éxito en estos programas podría implicar que el consumo excesivo de estos alimentos produce alteraciones en los mecanismos que regulan el apetito, indicando así que los individuos podrían presentar dificultades para autocontrolar la ingesta de grasas y azúcares debido al deterioro de las funciones en el sistema nervioso central (Nabil *et al.*, 2020; Van Son *et al.*, 2021).

2.2 Obesidad: causas y consecuencias a la salud

La obesidad es una enfermedad multifactorial (WHO, 2021; Zanini *et al.*, 2017) caracterizada por aumento en el peso corporal a consecuencia de la acumulación anormal o excesiva de grasa (García-Galbis *et al.*, 2021; Marseglia *et al.*, 2015; Ojetola *et al.*, 2021; Schmitz *et al.*, 2021; WHO, 2021; Zanini *et al.*, 2017). El aumento corporal se asocia con mayor ingesta de alimentos densos en calorías (Choi *et al.*, 2020; WHO, 2021; Zanini *et al.*, 2017) y menor actividad física, consecuencia de un creciente estilo de vida sedentario (Bonomini *et al.*, 2015; Corsica & Hood, 2011; Martin & Davidson, 2014; Zanini *et al.*, 2017), lo cual representa un excesivo consumo de energía constante que no es gastado por el cuerpo y en su lugar es almacenado en forma de grasa. Además de esto, también influyen factores ambientales, sociales, genéticos y epigenéticos (Page *et al.*, 2020).

Una dieta rica en calorías proporciona un exceso de macronutrientes (principalmente grasas y azúcares) que genera estrés en la maquinaria metabólica de los individuos (Kalivarathan *et al.*, 2017). La exposición a este tipo de dietas durante los períodos críticos del desarrollo, puede afectar de manera significativa la salud y el metabolismo en la vida posterior (Hauner & Brunner, 2015; Symonds *et al.*, 2009; Van de Heijning *et al.*, 2017). Por otro lado, la carente calidad en cuanto a nutrientes repercute en la programación nutricional del fenotipo metabólico adulto (Ailhaud & Guesnet, 2004; Muhlhausler *et al.*, 2010; Van de Heijning *et al.*, 2017).

La obesidad ocasiona alteraciones en el organismo tales como: EO, inflamación y disfunción mitocondrial (de Mello *et al.*, 2019; Mullins *et al.*, 2020), y

su presencia predispone a un mayor riesgo de desarrollar varias enfermedades (Marseglia *et al.*, 2015; Zanini *et al.*, 2017), entre las que destacan: las cardiovasculares, respiratorias, gastrointestinales, la resistencia a la insulina, desórdenes músculo-esqueléticos, algunos cánceres y síndrome metabólico (Choi *et al.*, 2020; de Mello *et al.*, 2019; García-Galbis *et al.*, 2021; Mullins *et al.*, 2020; Schmitz *et al.*, 2021).

2.3 Alteraciones cognitivas inducidas por la obesidad y la dieta

En sujetos que padecen obesidad, se han reportado deterioros en diversas funciones cerebrales como: la memoria episódica, habilidad verbal, memoria de trabajo y funciones ejecutivas (Bracke *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2013; Dye *et al.*, 2017; Kumar & Kelly, 2017; Li *et al.*, 2008; Martin & Davidson, 2014; Mullins *et al.*, 2020; Prickett *et al.*, 2014; Savas *et al.*, 2019), mostrando una correlación directamente proporcional al índice de masa corporal (IMC) de la persona (Dye *et al.*, 2017; Gonzales *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2016). Aunado a esto, diversos estudios de imagen muestran una disminución del volumen cerebral total (Chan *et al.*, 2013) asociado de igual manera con el IMC. Así como, una actividad funcional disminuida en la CPF (Willeumier *et al.*, 2011), el hipocampo y la corteza angular asociadas con la memoria episódica (Cheke *et al.*, 2017).

En niños, la obesidad se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo de la CPF y una función ejecutiva deteriorada. De tal forma, que la obesidad afecta la integridad estructural y funcional del cerebro (Liśkiewicz *et al.*, 2021; Nota *et al.*, 2020; Structure *et al.*, 2020). De tal forma que se han visto alteraciones en el cerebro a todos los niveles y en cualquier etapa del desarrollo (Hawkins *et al.*, 2021).

Además, se sabe que el hipocampo puede ser afectado previo al aumento de peso (Liśkiewicz *et al.*, 2021), sugiriendo que el cerebro pudiera ser particularmente vulnerable a los efectos de dietas hipercalóricas y sus componentes, durante los primeros periodos de vida, por ser etapas de rápido crecimiento y maduración, teniendo sus efectos deletéreos en funciones de memoria y aprendizaje (Noble & Kanoski, 2016). Entre los componentes dietéticos asociados con una menor función cognitiva se encuentra el aporte de grandes

cantidades de ácidos grasos saturados y carbohidratos, particularmente azúcares simples, pudiendo perpetuar una disfunción cognitiva rápidamente posterior a la exposición de la dieta (Beilharz *et al.*, 2015).

2.4 Desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), está implicado en respuestas adaptativas a estresores (Incollingo Rodriguez *et al.*, 2015; Janthakhin *et al.*, 2022; Ouakinin *et al.*, 2018). Los componentes del eje HHA se comunican por diversos mediadores neuroendocrinos: hormona liberadora de corticotropina, hormona adrenocorticotropa (ACTH) y cortisol (corticosterona en roedores), los cuales están controlados por retroalimentación negativa, que involucra al hipotálamo, así como otras estructuras cerebrales: hipocampo, CPF, y el núcleo del tracto solitario. Esta respuesta de retroalimentación negativa se logra por la activación de receptores a glucocorticoides (RG) que se encuentran en las estructuras cerebrales antes citadas (Adzic *et al.*, 2009).

Durante la obesidad ocurre una desregulación del eje HHA (Prodam *et al.*, 2013; Vaidya, 2016) asociado al incremento de tejido graso y a una hiperactividad del mismo (Baker *et al.*, 2017). La exposición del tejido adiposo a glucocorticoides contribuye a la movilización de reservas energéticas y, de manera crónica, a un mayor almacenamiento de lípidos en los adipocitos, aumentando las reservas viscerales (de Kloet & Herman, 2018) contribuyendo a la disminución de la respuesta de retroalimentación del eje (Kloet *et al.*, 2015). Aunado a esto se ha reportado, en estudios preclínicos de obesidad, un aumento de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1) en tejido adiposo (Nestorov *et al.*, 2014), la cual incrementa de manera local la concentración de corticosterona (Abraham *et al.*, 2013; Vaidya, 2016), contribuyendo a la obesidad y diversas alteraciones metabólicas asociadas (Prince *et al.*, 2017). Este incremento en la actividad de la 11 β HSD1, se ha asociado con componentes de la dieta, como la fructosa (Legeza *et al.*, 2017) y la grasa (Prasad *et al.*, 2020).

La desregulación del eje HHA en la obesidad genera alteraciones en las concentraciones de insulina y del neuropéptido Y (Bose *et al.*, 2009; Suzuki, 2020;

Wake *et al.*, 2006), así como el desarrollo de síndrome metabólico (Akalestou *et al.*, 2020; Kloet *et al.*, 2015; Ouakinin *et al.*, 2018) al asociarse con dislipidemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina (Akalestou *et al.*, 2020).

Las principales hormonas de este eje (ACTH y corticosterona), se han implicado en procesos de consolidación de la memoria (Dionysopoulou *et al.*, 2021), y su desregulación a la alza de manera crónica promueve deterioro cognitivo (López-Taboada *et al.*, 2020; Lupien *et al.*, 2009; Makhathini *et al.*, 2017; McEwen *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2021) a través de la activación de los RG, distribuidos en ampliamente en el hipotálamo, en la CPF y en el hipocampo (Lupien *et al.*, 2007; Tatomir *et al.*, 2014), región vulnerable en donde se induce muerte neuronal y disminución de la neurogénesis (Lupien *et al.*, 1998; Tatomir *et al.*, 2014). Esta desregulación a largo plazo, a nivel mitocondrial, producen anomalías estructurales generando una disfunción del transporte de electrones en la cadena respiratoria que disminuye la producción de adenosín trifosfato (ATP) (Adzic *et al.*, 2009; Alesci *et al.*, 2006).

2.5 Modelos animales de obesidad

Debido a la complejidad de la enfermedad humana, se han utilizado diversos modelos animales que tratan de imitar algunas de las alteraciones presentes. Estos modelos permiten el estudio de un determinado evento en sistemas biológicos complejos que se pueden controlar, manipular y tomar muestras directas de tejidos relevantes, cubriendo las condiciones que no son éticas o prácticas para los estudios en humanos (Little *et al.*, 2021; Wayhart & Lawson, 2017). Estos modelos permiten identificar puntos en común que están altamente conservados entre especies (Little *et al.*, 2021). Incluso cuando los modelos animales no imitan fielmente el trastorno humano, se pueden obtener nuevos conocimientos biológicos a partir de un enfoque *in vivo* (Wayhart & Lawson, 2017).

Los murinos (ratones y ratas) han sido esenciales en la investigación biomédica por varias razones: son animales altriciales, que como el humano dependen del cuidado parental, además de la facilidad de cría y tenencia, lo que permite el mantenimiento de un gran número de animales para la investigación

(Little *et al.*, 2021). De tal forma que se han desarrollado diversos modelos de obesidad en este tipo de animales, como los modelos monogénicos, en los que un gen es disfuncional (*agouti*, *fat*, *tubby*, *obese*, and *diabetes*), provocando deficiencias en vías de señalización que intervienen en la homeostasis energética (Lutz & Woods, 2012). Este tipo de modelos tiene la desventaja de que la génesis de la obesidad es producto de la alteración de una única vía de señalización (Suleiman *et al.*, 2020).

Otro modelo es el de obesidad inducido por dieta (OID) hipercalórica o hiperlipídica, es un modelo animal poligénico, e imita la obesidad que ocurre en seres humanos mejor que los modelos con modificaciones genéticas (Lutz, 2018; Lutz & Woods, 2012; Rosini *et al.*, 2012). Además, presenta gran parecido con la génesis y las respuestas metabólicas inducidas por la obesidad en humanos (Rosini *et al.*, 2012). Estos modelos tienen la ventaja de presentar anomalías de una forma más rápida que en seres humanos, pudiendo ser monitoreados desde momentos tempranos (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020). Además de presentar desordenes asociados con la obesidad como la hiperglucemia, resistencia a la insulina y otras alteraciones metabólicas (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020; Rosini *et al.*, 2012). Entre sus desventajas están que la definición de obesidad se ha determinado para poblaciones humanas, dificultando determinar si los animales son obesos; las alteraciones ocurren de forma variada debido al tipo de animal, el tipo de dieta, el momento de inicio y su duración, por lo que no replica del todo las alteraciones metabólicas y fisiológicas (Rodríguez-Correa *et al.*, 2020).

2.6 Memoria de reconocimiento en roedores y sustrato neuroanatómico.

La memoria de reconocimiento es un proceso neuronal por el cual un sujeto es consciente de que un estímulo ha sido experimentado de manera previa (Aggleton, 1998; Brown *et al.*, 2010; Steckler *et al.*, 1998). Este tipo de memoria ha sido estudiada en roedores e implica la participación de diversas estructuras cerebrales: como son las cortezas prefrontal medial (Chao *et al.*, 2016; Eichenbaum, 2017;

Sampaio *et al.*, 2020), entorrinal y perirrinal (Brown *et al.*, 2010), así como del hipocampo (Cruz-sanchez *et al.*, 2021; Clea Warburton & Brown, 2010; Winters *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015; Yavas *et al.*, 2019), el subículo, el giro dentado (Dees & Kesner, 2013) y el tálamo dorsomedial (Steckler *et al.*, 1998; Warburton & Brown, 2015). Estas áreas son importantes para este tipo de memoria, ya que la inhibición farmacológica y lesión, resulta en déficits de la memoria episódica (Brasilino *et al.*, 2019; Cholvin *et al.*, 2013; Dere *et al.*, 2007; Jacklin *et al.*, 2016).

Para el funcionamiento correcto de este tipo de memoria se requiere de la participación de diversas conexiones (Figura 1) que reciben la información ambiental en áreas primarias de procesamiento (corteza visual), la cual pasa a áreas de asociación que después se conectan con la corteza perirrinal o parahipocampal de las cuales surgen proyecciones a la corteza entorrinal, el subículo y la región CA1 del hipocampo. Estas últimas a su vez, se proyectan directamente a las cortezas prelímbicas, infralímbicas y cinguladas anteriores, es decir, a las áreas corticales prefrontales mediales, y a la corteza retrosplenial (Dere *et al.*, 2007; Eacott & Easton, 2010; Preston & Eichenbaum, 2013; Sugar, 2019; Warburton & Brown, 2015). Por lo que se describen una vía dorsal del *dónde* y una ventral del *qué* (Preston & Eichenbaum, 2013; Sugar, 2019).

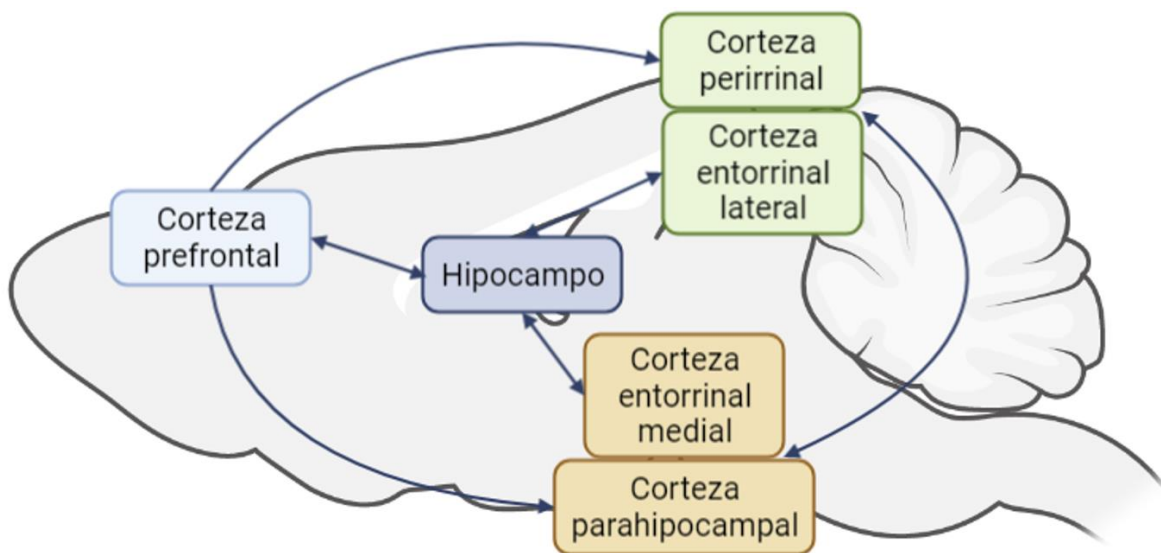


Figura 1. Diagrama del sustrato neuroanatómico de la memoria de reconocimiento. Tomado y modificado de Preston & Eichenbaum (2013).

2.7 Evaluación de la memoria de reconocimiento en roedores

Para la evaluación de la memoria de reconocimiento se requiere que las características percibidas de los eventos sean discriminadas, identificadas y comparadas (emparejadas) contra una memoria experimentada. Los ensayos consisten en tres fases: de muestra, un tiempo de retraso (o intervalo de retención) y de elección (comparación o prueba) (Aggleton, 1998).

Dos paradigmas utilizados para la evaluación de la memoria de reconocimiento en roedores son: el reconocimiento de objeto novedoso (RON) y el reconocimiento de nueva localización de objeto familiar (RNL) (Figura 2). Este tipo de tareas aprovechan la capacidad innata de los roedores para explorar objetos novedosos frente aquellos que resultan familiares, y su utilización para el estudio de la memoria episódica es bien reconocida (Ennaceur, 2010), además de evitar sesgos causados por un componente estresante o utilización de alimentos como reforzador positivo que presentan otras pruebas (Naneix *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020).

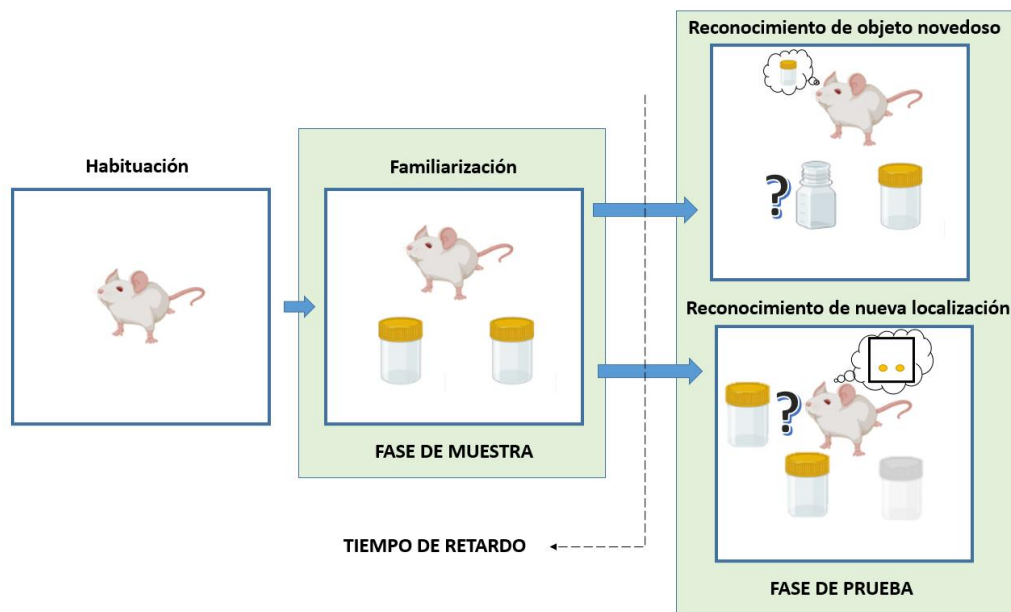


Figura 2. Diagrama de las etapas para la evaluación del reconocimiento de objeto novedoso y nueva localización de objeto. Tomado y modificado de Martínez-Orozco (2020).

En modelos animales de OID con DAGAF se han reportado alteraciones de tareas de memoria dependientes del hipocampo, las cuales se resumen en la Tabla 1. A pesar de esto, un metaanálisis mostró que no todos los modelos de OID presentaron alteración en dichas tareas. Lo cual puede asociarse al tipo de modelo animal, la edad de inducción, los componentes de la dieta, el tiempo de administración de la dieta y las características de las pruebas conductuales (Gladding *et al.*, 2018).

Existe evidencia del efecto perjudicial de la dieta sobre la memoria dependiente del hipocampo, que es independiente de los efectos ocasionados por la obesidad o la disfunción metabólica, tales efectos pudieran deberse al aumento del EO, a una menor integridad de la barrera hematoencefálica (Lin *et al.*, 2017), entre otros mecanismos. Sin embargo, el mediador específico de este deterioro sigue siendo desconocido (Willeumier *et al.*, 2011).

Debido al rol central que cumple el EO en el desarrollo de alteraciones metabólicas durante la obesidad (Matsuda & Shimomura, 2013), y su asociación en la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas (Niedzielska *et al.*, 2016; Ruszkiewicz & Albrecht, 2015), el aumento del EO en diversas estructuras cerebrales se ha asociado con el desarrollo de déficits en la memoria (Mi *et al.*, 2017).

Tabla 1. Diferentes dietas obesogénicas y su impacto en la memoria.

ANIMAL/EDAD	DIETA/DURACIÓN	PARADIGMA	RESULTADOS	AUTOR
Sprague-Dawley / adulto joven (250-300 g)	DAGAF 12 sem	RON y LAM	↓ IR ↑ Latencia de escape ↑ Latencia de retención	(Chávez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2022)
C57BL/6J / 14 sem	DAGAF 10 sem	RON y RNL	↓ ID	(Martínez-Orozco, <i>et al.</i> , 2021)
C57BL/6J / 9 sem	DAGA/F (H ₂ O) / 14 sem	LEY, RON, LAM	↓ Alternancia espontánea, tiempo en CO ↑ ID e IP. Latencia	(Mulati, Zhang, Zhao, Ren, Wang, Liu, <i>et al.</i> , 2021)
Sprague-Dawley / adulto joven (250-300 g)	DAGAF 12 sem	LAM	↑ Latencia de escape ↓ Número de cruces y tiempo en CO	(Espinosa-García <i>et al.</i> , 2020)
Wistar / 6 sem	DAGAF y F (H ₂ O) / 8 sem	RON	Sin diferencias en el IR	(Gancheva & Zhelyazkova-Savova, 2020)
C57BL/6J / 9 sem	DAGA/F (H ₂ O) / 14 sem	LEY, RON, LAM	↓ Alternancia espontánea e ID. ↑ Latencia	(Mulati <i>et al.</i> 2020)
Wistar/ 5 sem	DAGAF / 60 d	LAM y LR	↑ Latencia, error en la memoria de referencia radial. ↓ Tiempo en CO	(Kalivarathan <i>et al.</i> , 2020)
C57BL/6J / 6 sem	DAGAF / 6 meses	LAM	↑ Latencia ↓ Mejora de la latencia de escape	(Mamo, <i>et al.</i> , 2019)
Sprague Dawley / 8 sem	DAG/F (H ₂ O) / 14 sem	RON y LEY	↓ ID y de la alternancia espontánea.	(Yu <i>et al.</i> , 2019)
C57BL/6J / 3 meses	DAG/F (H ₂ O) / 10 sem	LEY y LAM	↓ Alternancia espontánea ↑ Latencia y distancia de escape ↓ Tiempo en CO	(Wang <i>et al.</i> , 2019)
Wistar / 6 sem	DAGAF / 6 sem	LAM	Latencia sin cambios ↓ Tiempo en CO	(Lin <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6J / 3 meses	DAG/F (H ₂ O) / 12 sem	LAM	↑ Latencia ↓ Tiempo en CO y cruces de plataforma.	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6J / 6 sem	DAGAF / 24 sem	LAM	↑ Latencia	(Mamo <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6J / 3 meses	DAG/F (H ₂ O) / 16 sem	LAM	↑ Latencia ↓ Tiempo en CO	(Mi <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6J / 6 sem	DAGAF / 24 sem	LAM	↑ Latencia	(Takechi <i>et al.</i> , 2017)
Wistar / 5 sem	DAGAF / 8 sem	LEY	↓ Interacciones con el brazo de novedoso	(Anderson <i>et al.</i> , 2013)

DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa, F(H₂O): Fructosa en agua. RON: Reconocimiento de objeto novedoso. RNL: Reconocimiento de nueva localización de objeto. LAM: laberinto acuático de Morris. LEY: laberinto en Y. LR: laberinto radial. ID: índice de discriminación IR: índice de reconocimiento. CO: cuadrante objetivo. sem: semanas. h: horas.

2.8 Estrés oxidante inducido por dieta obesogénica

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos altamente reactivos con la presencia de uno o más electrones desapareados en su último orbital, que incluyen oxígeno molecular (O_2) y otras ERO generados por los pasos secuenciales de reducción de un electrón del O_2 : radical superóxido anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Halliwell, 2006). Además, otros compuestos pueden ser susceptibles de una reducción parcial, como el nitrógeno que genera especies reactivas de nitrógeno: óxido nítrico ($NO\cdot$) el cual puede reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ produciendo peroxinitrito ($ONOO\cdot$) que junto con el $OH\cdot$ son los causantes más importantes de daño oxidante (Poon *et al.*, 2004).

Las ERO se producen de forma principal como resultado colateral de la utilización del O_2 como aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones para la producción de energía, en forma de ATP (Le Gal *et al.*, 2021). Sin embargo, en otros casos, las ERO pueden ser generadas deliberadamente por las mitocondrias y diversas enzimas extra mitocondriales (xantina oxidasa, la óxido nítrico sintetasa, citocromo P450, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADPH] oxidasa [NOX], lipooxigenasas y ciclooxigenasas) (Görlach *et al.*, 2015; Valko *et al.*, 2006), teniendo funciones biológicas importantes al fungir como importantes moléculas de señalización (Leloup *et al.*, 2011; Valko *et al.*, 2006) en la regulación del metabolismo, muerte celular, diferenciación y desarrollo, respuestas inmunes, ritmo circadiano y otros. Por desgracia, un desequilibrio entre la producción endógena de pro-oxidantes y del sistema de defensa antioxidante del organismo en favor de lo oxidante, propicia la aparición de EO (El-Ansary, 2012; Niedzielska *et al.*, 2016; Yaribeygi *et al.*, 2018).

La acumulación excesiva y ectópica de grasa que caracteriza a la obesidad, altera la función del tejido adiposo perpetuando la aparición de inflamación, hipoxia y EO (Bayliak *et al.*, 2019). Además, la disminución de la capacidad antioxidante, la hiperleptinemia, la dislipidemia, la generación anormal de ERO, la disfunción tisular y la inflamación crónica, juegan un papel importante en la generación de EO asociado a la obesidad (Savini *et al.*, 2016). De la misma forma, el exceso de sustratos aportados por la dieta da como resultado un incremento en la oxidación

de glucosa y lípidos, con el consiguiente aumento de donadores de electrones en la cadena de transporte de electrones (Matsuda & Shimomura, 2013).

El aumento de glucocorticoides de manera aguda incrementa la respiración mitocondrial (Du *et al.*, 2009; Spiers *et al.*, 2015), y de manera crónica ocasiona una disfunción en la cadena de transporte de electrones, anomalías mitocondriales estructurales, aumento en la producción de ERO, apoptosis y muerte celular (Manoli *et al.*, 2007). Además, este aumento de ERO disminuye la retroalimentación negativa del eje HHA (Asaba *et al.*, 2004; Spiers *et al.*, 2015) favoreciendo el desequilibrio en dicho eje.

2.9 Peroxidación lipídica

El EO tiene la característica de dañar diversas macromoléculas presentes en sistemas biológicos: ácido desoxirribonucleico, proteínas, lípidos y carbohidratos (Matsuda & Shimomura, 2013). Pudiendo ser determinado e identificado por diversos biomarcadores como: 8 Hidroxil-2-desoxiguanosina, malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal, mieloperoxidasa y productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA) (El-Ansary, 2012; Halliwell, 2006; Poon *et al.*, 2004), entre otros.

Las membranas biológicas, son estructuras celulares susceptibles a los efectos del EO. Esto por el hecho de que el O₂ y sus especies reactivas son más solubles en la bicapa lipídica que en solución acuosa, siendo las regiones orgánicas las que pueden contener más radicales libres que las regiones acuosas (Pamplona, 2008). En segundo lugar, se encuentra la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los cuales exhiben una oxidación aumentada en función al número de dobles enlaces de la molécula (Barrera *et al.*, 2016; Gardner, 1989; Pamplona *et al.*, 2002).

A este proceso se le conoce como lipoperoxidación (LPO), el cual consiste en una poderosa reacción en cadena que resulta en la degradación oxidante de los lípidos (Bartolacci *et al.*, 2021; Cortés-Rojo *et al.*, 2010; Gianazza *et al.*, 2019). distinguiéndose tres fases: iniciación, propagación y terminación (Gardner, 1989; Porter *et al.*, 1995; Schneider, 2010).

Los peróxidos o hidroperóxidos son los principales productos de la LPO, que tienen la característica de ser inestables y descomponerse en aldehídos, cetonas y otras subestructuras reactivas (Pratt *et al.*, 2011). Estos productos son químicamente reactivos y capaces de alterar la señalización y supervivencia celular (Barrera *et al.*, 2016), por sus capacidades de provocar modificaciones en el ADN y las proteínas (Porter *et al.*, 1995).

Los aldehídos que resultan de la LPO son: 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-hexenal, nonenal, acroleína, glioxal, metilglioxal, 4-oxo-nonenal y MDA. Este último, es reactivo e interacciona con aductos de proteína y ácidos nucleicos, siendo altamente tóxico. Además de ser considerado un biomarcador de EO en el organismo. Su reactividad depende del pH así, un pH fisiológico genera productos de baja reactividad, pero a medida que este baja, la reactividad de sus productos aumenta (Gianazza *et al.*, 2019; Jové *et al.*, 2020).

2.10 Defensa antioxidante del organismo

Debido al daño que puede ocasionar el EO, los organismos han desarrollado formas de defenderse a través de antioxidantes, sustancias que en bajas concentraciones retrasan o previenen de manera significativa la oxidación de diversos sustratos (Pamplona, 2008) (Figura 3). Estos pueden ser exógenos (vitamina C y E) o endógenos enzimáticos, como son: las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT) y las glutatión peroxidasas (GPx) (Fraunberger *et al.*, 2016). Las SOD son metaloproteínas que catalizan la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 por descomposición oxidativa (Fried, 1975; Lee *et al.*, 2020; Lushchak *et al.*, 2021; Ogawa *et al.*, 1997; Sbodio *et al.*, 2019) y presenta 3 isoformas diferentes (Lee *et al.*, 2020; Ogawa *et al.*, 1997; Sbodio *et al.*, 2019), con actividad diferencial en los compartimentos celulares (Adachi & Wang, 1998; Banci *et al.*, 1998; Dunah *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2020; Sbodio *et al.*, 2019; Weisiger & Fridovich, 1973). La CAT es importante en la desintoxicación de H_2O_2 oxidante catalizando la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 (Calabrese & Canada, 1989; Lee *et al.*, 2020; Sbodio *et al.*, 2019). Finalmente, la GPx reduce el H_2O_2 en el citosol y las mitocondrias, utilizando glutatión para reducir los peróxidos y producir disulfuro de glutatión y H_2O (Salminen

& Paul, 2014; Sbodio *et al.*, 2019). Se conocen 8 isoformas con localización y actividad diferente en las células del organismo (Adachi & Wang, 1998; Calabrese & Canada, 1989; Salminen & Paul, 2014).

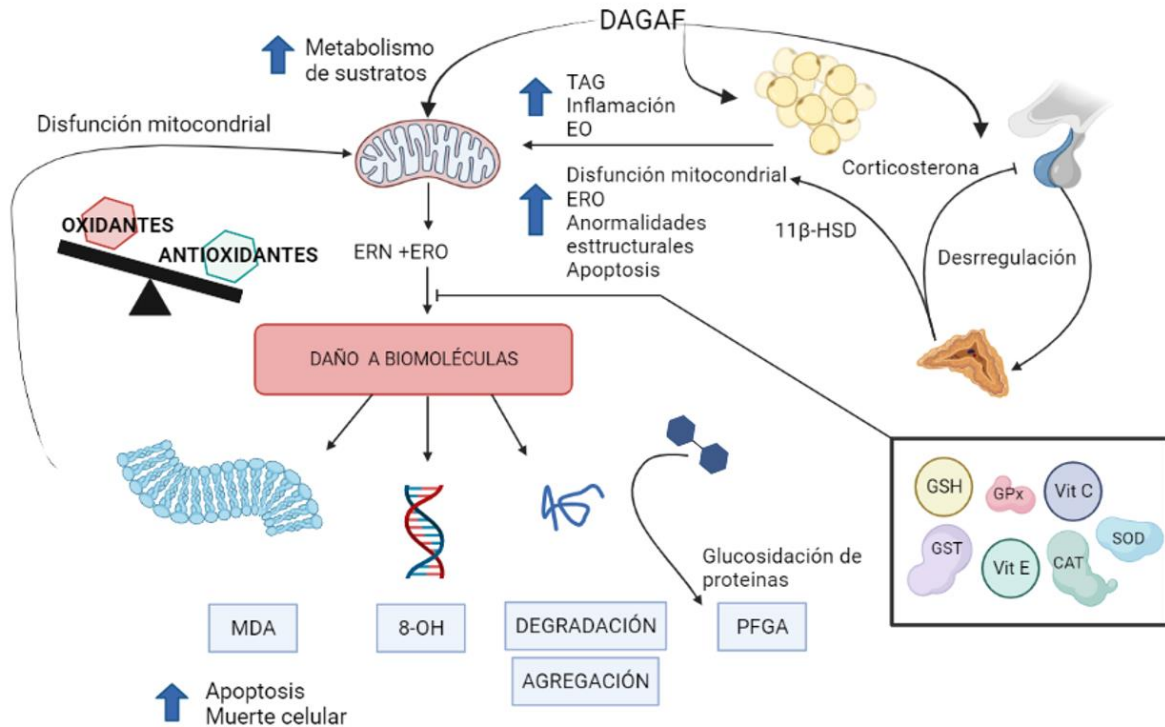


Figura 3. Mecanismos por los que la DAGAF genera ERO y las principales defensas antioxidantes

2.11 Vulnerabilidad del parénquima cerebral al estrés oxidante

El cerebro es especialmente susceptible al ERO en comparación a otros órganos del cuerpo. Esto debido a diversos factores propios del parénquima cerebral:

- Alto consumo de O₂: a pesar de corresponder solamente al 2% del peso corporal, recibe de 10-16% del gasto cardíaco y aproximadamente el 20% del O₂ de todo el organismo (Cobley *et al.*, 2018; Williams & Leggett, 1989), debido al exhaustivo funcionamiento cerebral (Pareek *et al.*, 2019). Este gas tiene capacidad de dar lugar a ERO radicales libres como O₂^{•-}, y OH[•], y no radicales como H₂O₂ (Cobley *et al.*, 2018).
- Alto aporte de glucosa: consume el 25% de la glucosa sanguínea para mantener la función neuronal, la cual genera productos finales de la

glucosilación avanzada que son capaces de generar inhibición proteica y EO inducido por glucosa (Lee *et al.*, 2020).

- Alto contenido en ácidos grasos insaturados peroxidables: en especial ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico, los cuales son susceptibles a la peroxidación por su abundancia dobles enlaces (Berg *et al.*, 2011).
- Sistema antioxidante escaso (Halliwell, 2006): su contenido de CAT es 50 veces inferior al de los hepatocitos, además de una actividad restringida de GPx4 (Lee *et al.*, 2020). Esto obliga a las defensas antioxidantes a trabajar a niveles casi máximos incluso en un estado saludable (Berg *et al.*, 2011).
- Abundante contenido de metales de transición (Ren *et al.*, 2017; Wang & Michaelis, 2010): los cuales son ingredientes clave de LPO, ya que a través de la reacción de Fenton son capaces de generar ERO (Cobley *et al.*, 2018; Halliwell, 2006).
- Gran generación de H₂O₂: a través de la SOD y otras enzimas presentes en las membranas mitocondriales externas de las neuronas y la glía (diversas enzimas dependientes de flavina, monoaminoxidasas A y B), además de fungir como molécula de señalización junto con el O₂⁻ (Cobley *et al.*, 2018).
- Flujos abundantes de Ca²⁺: generados durante la exocitosis de vesículas sinápticas, pueden estimular la enzima óxido nítrico sintetiza (generando NO^{*}), inhibiendo de manera indirecta la respiración celular por unión al citocromo oxidasa C y generando ONOO⁻ al reaccionar con el O₂⁻ (Cobley *et al.*, 2018; Görlach *et al.*, 2015).
- Gran producción de ATP (Cobley *et al.*, 2018): las neuronas requieren altos niveles de energía para el mantenimiento del potencial de membrana y la función neuronal. El aporte de esta energía es dado por las mitocondrias las cuales son las principales generadoras de ERO (Wang & Michaelis, 2010).
- Auto-oxidación de neurotransmisores: algunos neurotransmisores son susceptibles de oxidación como lo es el caso de la dopamina que puede reaccionar con el O₂ y generar O₂⁻ (Cobley *et al.*, 2018).

- Las neuronas maduras son células post-mitóticas: estas células son más sensibles al EO, debido a su reposición restringida por parte de células progenitoras (Pamplona, 2008; Pareek *et al.*, 2019; Wang & Michaelis, 2010).
- Presencia de células de la respuesta inmune (microglía): que al activarse generan $O_2^{\cdot-}$ con función biológica contra patógenos a través de NOX, la cual es extremadamente sensible a la biodisponibilidad de O_2 y de NADPH (Cobley *et al.*, 2018).

Aunado a esto, existen regiones en el cerebro más sensibles al daño ocasionado por ERO: el hipocampo (especialmente CA1) y las células de la capa granulosa del cerebelo (Berg *et al.*, 2011; El-Ansary, 2012). El desbalance del estado *redox* en el cerebro por efecto de DAGAF se ha comprobado en modelos experimentales como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Diferentes DAGAF y su impacto sobre el EO del cerebro.

ANIMAL/EDAD	DIETA/DURACIÓN	MARCADORES DE EO	RESULTADOS	AUTOR
Wistar / 5 sem	DAGAF / 12 sem 20% G/46% F	SOD, GPx, GSH, AU, NF-κB, y Nrf2	↑ NF-κB ↓ Nrf2 en CPF; SOD, GPx, GSH, AU séricos.	(Batandier <i>et al.</i> , 2020)
Sprague-Dawley / 11 meses	DAGAF / 4 sem 39% G /30% F	CAT, GPx UCP2, PGC-1, PPARα, MDA, N-Tyr	↑ MDA, N-Tyr en hipocampo. UCP2, PGC-1α y PPARα. Resto sin cambios	(Crescenzo <i>et al.</i> , 2019)
Wistar / (200-250 g)	DAGAF / 12 sem 15% G /15% F	MDA, proteínas carboniladas, SOD, GPx	↑ MDA y proteínas carboniladas SOD y GPx en cerebro ↓	(Amri <i>et al.</i> , 2017)
Wistar / 5 sem	DAGAF / 60 d 43% G /45% F	MDA, 3-NT, 4-HNE, AOPP, PCO, SOD, CAT, GPx, Vit C, Vit E, GSH	↑ MDA suero e hipocampo, 3-NT, 4-HNE ↓ SOD, CAT, GPx, VIT C, E Y GSH en suero e hipocampo	(Kalivarathan <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6 / 6 sem	DAGAF / 6 meses 30% G /15% F	ERO (dihidroetidio) en el cerebro	Sin cambios	(Mamo <i>et al.</i> , 2017)
C57BL/6J / 3 meses	DAGA/F (H ₂ O) / 16 sem 45% G /10% F	iNOS y ERO (DCF)	↑ Expresión de iNOS y ERO mitocondrial en hipocampo	(Mi <i>et al.</i> , 2017)

DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. F (H₂O): Fructosa en agua. SOD: superoxido dismutasa. CAT: Catalasa. GSH: Glutación. GPx: Glutación peroxidasa. AU: Ácido úrico. MDA: malondialdehido. GST: glutación transferasa. VIT. C: vitamina C. VIT. E: vitamina E. UCP2: proteína de desacoplamiento mitocondrial 2. PGC-1 α: coactivador y del receptor activado por el proliferador de peroxisomas. PPARα: receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas. NF-κB: factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de células B activadas. Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2. N-Tyr: Nitrotirosina.

3. Justificación

El sobrepeso y la obesidad de los humanos en todas las regiones del mundo representa un grave problema, siendo de vital importancia su aumento en la población infantil, ya que tienden a continuar en etapas posteriores del desarrollo, aumentando el riesgo de padecer diversas comorbilidades y complicaciones en la vida adulta.

La principal causa de este problema es el consumo de dietas hipercalóricas. La exposición temprana a este tipo de dietas puede afectar la correcta maduración y funcionamiento de diversas estructuras cerebrales sobre las que subyacen los procesos de memoria y aprendizaje. Además, su consumo crónico se ha relacionado con el aumento de diversas patologías, las cuales han sido asociadas con una mayor producción de ERO y una disfunción de la capacidad antioxidante, así como la activación de procesos inflamatorios, perpetuando un envejecimiento prematuro.

A pesar de esto, se han explorado poco los efectos de la obesidad inducida por una DAGAF, desde estadios tempranos del desarrollo, sobre la memoria de reconocimiento y su asociación con el desequilibrio *redox* en el cerebro. Debido a la complejidad de la enfermedad y los problemas éticos que conlleva su estudio en la población humana, el presente trabajo se plantea a nivel experimental en un modelo murino que nos permitirá evaluar dichos efectos, abriendo la posibilidad de futuros blancos terapéuticos para atenuar las alteraciones ocasionadas por este tipo de dieta en la población.

4. Pregunta de investigación

¿Generará el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa un deterioro de la memoria de reconocimiento en la rata macho por aumento del estrés oxidante?

5. Hipótesis

La DAGAF incrementará el EO y generará cambios en la expresión genética de las enzimas antioxidantes en el cerebro, que modificará la MR en la rata macho.

6. Objetivos

6.1 General

Evaluar los efectos del consumo de una dieta alta en grasa y fructosa sobre la memoria de reconocimiento en la rata macho, y su asociación con el estrés oxidante en el cerebro.

6.2 Específicos

Determinar los efectos de una dieta alta en grasa y fructosa sobre:

1. El índice de discriminación y de reconocimiento en los grupos experimentales.
2. Las concentraciones séricas de ACTH y corticosterona.
3. Las concentraciones de malondialdehído en suero.
4. Los biomarcadores de estrés oxidante en hipocampo y corteza prefrontal.
5. La relación del proceso cognitivo con los marcadores de daño oxidante.
6. La actividad de enzimas antioxidantes en hipocampo y corteza prefrontal.
7. La relación de la grasa visceral con los marcadores de estrés oxidante.
8. La expresión génica de las enzimas antioxidantes en hipocampo y corteza prefrontal.

7. Metodología

7.1 Animales experimentales

Un total de 20 ratas macho de la cepa Wistar de 21 días de edad, equivalente a la infancia temprana del ser humano (Sengupta, 2013; States, 2005) fueron utilizadas en este estudio. Los animales fueron proporcionados y mantenidos por el Departamento de investigación Experimental y Bioterio perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) bajo condiciones controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), de humedad relativa (40-70%) y con ciclo de luz/oscuridad 12:12 h. Los animales fueron alojados en grupos de dos dentro de cajas estándar de acrílico con cama de aserrín de madera virgen, con cambio periódico. El alimento y el agua se administraron *ad libitum*. Las ratas fueron

pesadas cada semana para evaluar los efectos de las dietas *per se* sobre la ganancia de peso. Los animales permanecieron de esta forma hasta el momento de la eutanasia.

7.2 Consideraciones éticas

Los procedimientos involucrados con los animales estuvieron acordes con la guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio del National Research Council (EUA) y lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999¹. El presente estudio fue aprobado bajo los lineamientos del Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del INCMNSZ (CICUAL-BRE-2019-20-22-1).

7.3 Dietas experimentales

Las ratas fueron divididas en dos grupos (n=10) a los que se les alimento con dos tipos de dietas previamente empleadas (Martínez-Orozco, *et al* 2021), un grupo con dieta control (DC: 11% kcal de grasa y 0% kcal de fructosa) y otro con dieta alta en grasas y fructosa (DAGAF: 48% kcal de grasa y 33% kcal de fructosa) durante un periodo de 20 semanas, en la Tabla 3 se detalla el porcentaje de macronutrientes y el aporte calórico por gramo de dieta.

Tabla 3. Porcentaje de macronutrientes y aporte de kcal por g de las dietas experimentales

DIETA	DC	DAGAF
Macronutrientes		
Grasa (%)	11	48
Proteínas (%)	20	19
Carbohidratos (%)	69	33
De los cuales fructosa (%)	0	33
Total	100	100
kcal/g	3.7	4.8

DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. kcal/g: Kilocalorías por gramo

La composición de cada una de las dietas se describe en la Tabla 4. Las dietas se prepararon en forma de pellets en la planta piloto del INCMNSZ y cumplen

¹ Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

con los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio establecidos en el documento de 1995 del National Research Council.

Tabla 4. Formulación de la DC y DAGAF g/Kg de dieta

Componente (g) por cada Kg de dieta	CONTROL	DAGAF
Caseína	190	225
L-cisteína	3	3
Almidón	521	-----
Maltodextrosa	146	-----
Fructosa	-----	410
Celulosa	50	50
Aceite	28	50
Manteca	-----	200
Minerales	50	20
Vitaminas	10	10
Colina	2	2

DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. g: gramo

7.4 Medición de peso corporal e ingesta

La ingesta de alimentos y calorías se cuantificaron durante los días que se evaluó la memoria de reconocimiento (12 días), dicha determinación se realizó colocando 2 animales del mismo grupo en una misma caja, se registró la cantidad inicial de alimento y 24 horas después se reportó la cantidad de alimento presente en el comedero, reponiéndolo de tal manera que la cantidad de este no fuera inferior a 50 g. El cálculo de la ingesta se realizó a partir de la diferencia del registro diario dividido entre 2. Para el cálculo de las kcal consumidas, se multiplico la ingesta diaria por las kcal aportadas por cada dieta. Finalmente, para la ingesta y calorías totales se calculó con la suma de lo obtenido en la ingesta y las kcal respectivamente, durante los 12 días en la que se realizó la determinación.

7.5 Evaluación de memoria de reconocimiento

Para mostrar el déficit en la memoria de reconocimiento en las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa por 20 semanas se evaluó la tarea reconocimiento de objeto novedoso (RON) y de nueva localización de objeto familiar (RNL).

Las pruebas se llevaron a cabo en campo abierto con medidas de 50x50x50 cm, entre las 10 y 14 horas, en cinco fases: habituación, familiarización, memoria a corto plazo (MCP), memoria a largo plazo temprana (MLP) y memoria a largo plazo tardía (MLPT). Se utilizó un paradigma de aprendizaje basado en la combinación de RON y RNL modificado (Pérez-García *et al.*, 2016). Previo al paso al cuarto de conducta, los animales se mantuvieron en un área iluminada con luz natural, con disponibilidad de agua y alimento, bajo condiciones de poco ruido ambiental durante 45 minutos (min). La fase de habituación consistió en una exploración libre en campo abierto durante 10 min por 3 días (d) consecutivos, esta fase está dirigida a reducir el estrés, la ansiedad y la exploración ambiental de los animales en el día de la prueba (Sampaio *et al.*, 2020).

En el día cuatro, se llevó a cabo la fase de familiarización, que consistió en la colocación de dos objetos exactamente iguales (Objetos A y Objeto A'), permitiendo la libre exploración de los animales de experimentación con ambos objetos durante un periodo de 10 min. Después de 2 horas (h) de la familiarización, para la evaluación de MCP, se realizó la prueba NOR/RNL, colocándose el objeto presentado previamente (Objeto A') y remplazándose el otro objeto por uno nuevo de características diferentes a los primeros (Objeto B), con una nueva disposición de los mismos permitiendo que las ratas interactuaran con ellos por 10 min. Al día siguiente, para la evaluación de MLP, se sustituyó el objeto familiar (Objeto A') por otro diferente a los conocidos (Objeto C) colocándose junto al objeto conocido (Objeto B) en una localización diferente a las anteriores, su duración fue igual al de las fases previas.

Por último, 7 d después la familiarización, para la evaluación de la MLPT, se sustituyó el objeto B por uno nuevo (Objeto D), cambiando la disposición del mismo permitiendo que los animales se relacionaran con ellos durante 10 min, el procedimiento se resume en la Figura 1. Después de retirar cada rata sometida a cada fase del paradigma, se limpió el aparato y se aplicó etanol al 70% directamente sobre el mismo (en el caso de las fases con objetos estos también fueron limpiados), dejándose secar para la colocación de un sujeto nuevo.

A partir de la fase de MCP se midió el índice de discriminación (ID) y el índice de reconocimiento (IR), para la comparación del tiempo de interacción con cada objeto presentado, utilizando las siguientes formulas:

$$ID = \frac{T_N - T_F}{T_N + T_F}$$

$$IR = \frac{T_N}{T_N + T_F}$$

Donde T_N representa el tiempo de exploración del objeto novedoso y T_F el tiempo de exploración del objeto familiar. Mediante el *software* ANY-maze Video Tacking Syatem Versión 4.73 (© 1999-2010 Stoelting Co.) se determinó tiempo de interacción con los objetos en las siguientes fases.

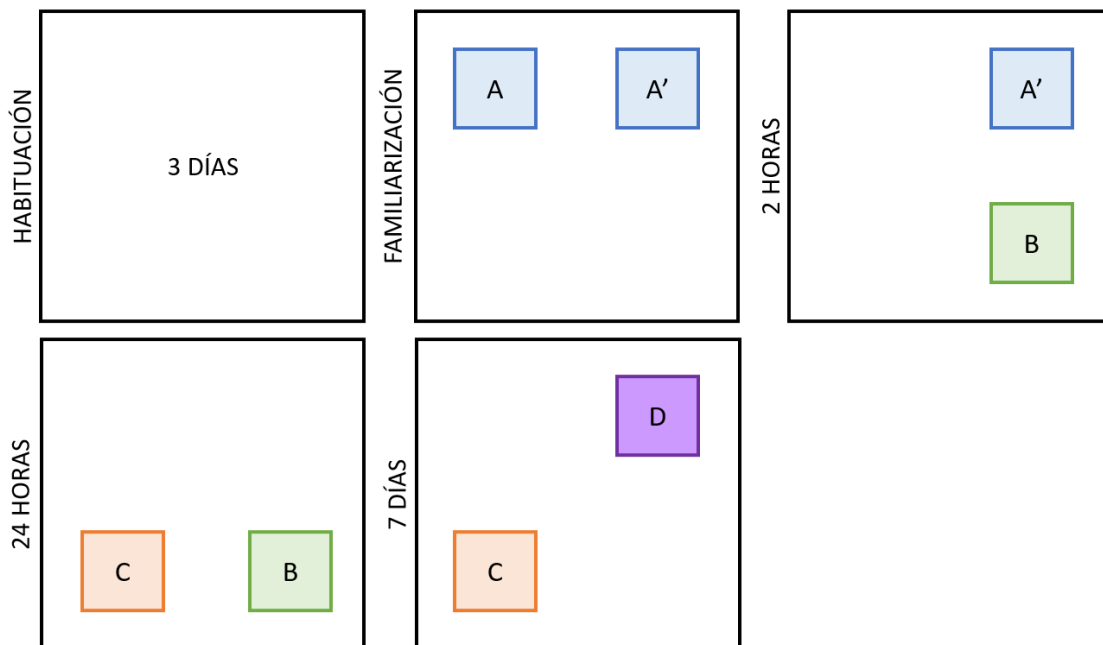


Figura 4. Diagrama esquemático del paradigma combinado de RON y RNL para la evaluación de memoria de reconocimiento, en las fases de familiarización, memoria a corto plazo, memoria a largo plazo y memoria a largo plazo tardía.

7.6 Evaluación de la composición corporal

Posterior a la examinación de la MR se evaluó la composición corporal de las ratas macho de los diferentes grupos experimentales, mediante el uso de un analizador de composición de cuerpo entero de 2 MHz (Echo Medical Systems, Houston, TX). Las ratas se colocaron en un tubo de acrílico transparente acorde al tamaño y peso del animal e introducidos en el equipo, sin tratamiento alguno (anestésico). Se insertó un tubo de diámetro ligeramente más pequeño, sostenido en su lugar por una correa de velcro, para confinar al animal en el extremo del tubo. El tubo se colocó horizontalmente dentro de la máquina de resonancia magnética (RM). Se realizaron dos escaneos independientes y los datos generados fueron registrados en una base de datos. Los datos obtenidos se expresaron como tejido magro y tejido graso. El estudio ocupa aproximadamente 3 min por cada rata. Previo al escaneo de los animales experimentales el equipo se calibró una muestra conocida de aceite de canola como control de calidad y se pesaron las ratas a estudiar para conocer su peso corporal (Castro-Rodríguez *et al.*, 2020).

7.7 Eutanasia y disección de cerebro

Una semana después de finalizar las pruebas conductuales se dio eutanasia a las ratas. Después de 8 h de ayuno, los animales fueron pesados e inmediatamente se procedió a la anestesia con SOFLORAN®VET (isoflurano, 100%) por vía inhalada a 3% hasta no presentar respuesta a estímulo doloroso del animal. A continuación, se realizó a una abdominotoracotomía previa asepsia y antisepsia, con posterior corte de la vena cava inferior y recolección de sangre. Enseguida se extrajo el cerebro por decapitación y subsiguiente craniectomía total. Se extrajo el cerebro para diseccionar el hipocampo y CPF con modificaciones de un protocolo reportado (Spijker, 2011). Se disecó hipocampo y la CPF. Los tejidos fueron almacenados a -70°C para su posterior análisis.

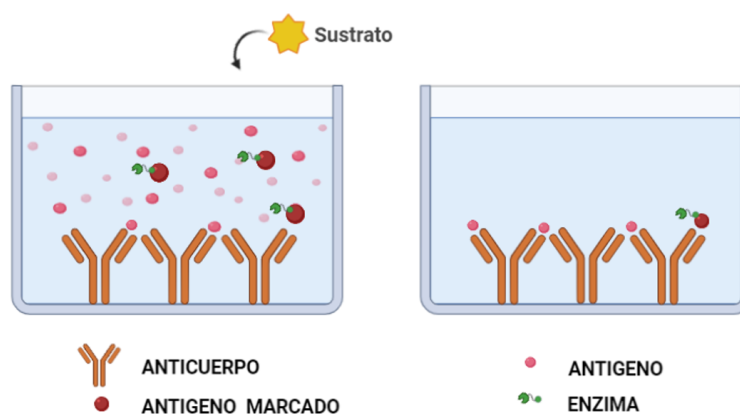
De manera simultánea se diseccionó tejido graso retroperitoneal, gonadal, mesentérico, pancreático y retroesternal, seguido del registro de su peso, para después calcular el índice de adiposidad con la fórmula: peso de grasa total / peso

del animal * 100 (Leopoldo *et al.*, 2016). Los restos biológicos se manejaron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002².

7.8 Determinación de corticosterona

Principio:

La corticosterona se determinó por la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) donde: la superficie de los pocillos se recubre con el anticuerpo específico a corticosterona (fase sólida). Se coloca una cantidad determinada de la muestra a medir y el antígeno marcado con enzimas se colocan en el pozo de manera simultánea, ambas compiten entre sí para unirse al anticuerpo los pozos. Después de la adición de la solución de sustrato, la concentración de corticosterona es inversamente proporcional a la densidad óptica medida (Aydin, 2015).



Esquema del ELISA de unión competitiva. Se presenta la reacción antígeno-anticuerpo, entre el anticuerpo específico y el antígeno marcado y no marcado, los cuales compiten por los sitios de unión.

Procedimiento:

Las concentraciones séricas de corticosterona se determinaron mediante ELISA en fase sólida, utilizando un estuche comercial para ratas, Corticosterone rat/mouse ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH Cat. No. DEV9922). La variabilidad intra e inter-ensayo fueron <6% y <7% respectivamente. La cantidad de suero utilizado

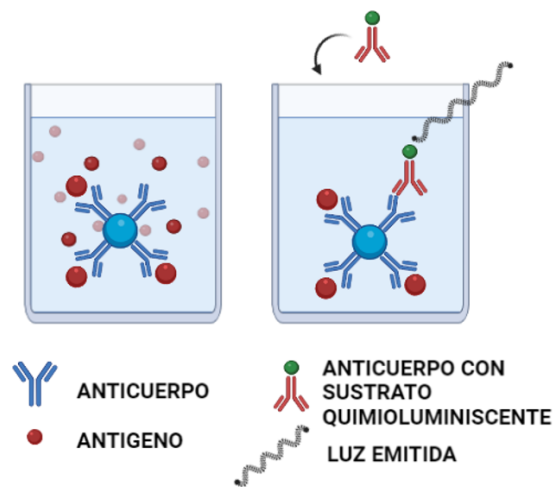
² Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico-infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo.

para la determinación fue de 50 µl por duplicado. La absorbancia se determina a 450 nm por 15 min (Zambrano *et al.*, 2020).

7.9 Determinación de ACTH

Principio:

Método de inmunoquimioluminiscencia, que consiste en una perla recubierta de anticuerpos específicos a ACTH, los sitios son ocupados por la hormona. Se adiciona un anticuerpo con sustrato quimioluminescente (unión anticuerpo-anticuerpo) que al regresar a su estado constitutivo emite luz. La cantidad de luz emitida es inversamente proporcional a la concentración de la muestra (Fereja *et al.*, 2013).



Esquema del inmunoquimioluminiscencia. Se presenta la reacción anticuerpo-anticuerpo con sustrato quimioluminiscente uniéndose a los sitios no ocupados por el antígeno. El sustrato al regresar a su estado constitutivo emite luz.

Procedimiento:

La ACTH se determinó mediante el ensayo de quimioluminiscencia utilizando un estuche comercial (Siemens 06601153 IMMULITE® Cat. No. LKAC5). La variabilidad intra e inter-ensayo fue de <8.4% y <9.2% respectivamente. El Kit se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las muestras se midieron por duplicado. La cantidad de plasma utilizada para la determinación fue de 50 µl.

La concentración se determina por cuentas por segundo (CPS) siendo inversamente proporcional a la concentración de la muestra (Allende *et al.*, 2004).

7.10 Biomarcadores de estrés oxidante

Para la evaluación de los biomarcadores de estrés en las muestras biológicas en particular el tejido cerebral se procesó de la siguiente manera: se pesó 0.1 g del hipocampo y CPF respectivamente, se colocaron en tubos de tipo Eppendorf de 1.5 ml, se adicionó 1 ml de solución salina (NaCl 0.9%) a 4°C y mantenidos en hielo. Las muestras se homogenizaron con un homogenizador mini motorizado con pistilo de teflón (DWK Life Sciences; No. Cat. SCERSP749540-0000) este proceso se realizó todo en frío. Posteriormente se hicieron alícuotas, las cuales se almacenaron a -70°C, para la posterior cuantificación de proteína por método de Bradford y la determinación de biomarcadores ERO y enzimas antioxidantes. La determinación de lipoperoxidación se realizó al momento de la homogeneización (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.10.1 Cuantificación de proteína por método de Bradford

Principio:

Método colorimétrico para determinar la cuantificación de proteínas, por medio de la variación de absorbancia producida por el cambio de color. El reactivo principal es el reactivo de Bradford el cual se prepara con el colorante azul brillante de Coomassie G-250, reacciona con los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos. Este compuesto tiene la propiedad de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul; la forma roja se convierte a azul cuando el colorante se une a la proteína. Esta unión provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm, lo que se mide es el aumento de la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

Procedimiento:

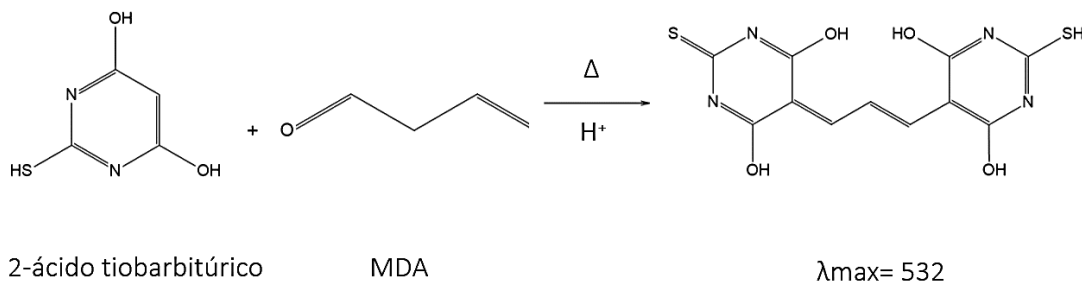
Se preparó una muestra de 1:5 del reactivo de Bradford (Bio Rad, No. Cat. 500-006), y una dilución 1:20 de las muestras de tejido cerebral (hipocampo y CPF). A continuación, se colocaron 5 μl de la dilución de la muestra por duplicado en placa de 96 pozos, junto con las muestras se colocaron los puntos de la curva estándar con albumina de suero bovino (ASB) con concentraciones de 0-12.5 $\mu\text{g/ml}$. Se adicionaron 200 μl de reactivo de Bradford dejándose incubar durante 5 min a temperatura ambiente (TA). La placa se leyó a 595 nm en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK).

7.10.2 Lipoperoxidación por TBARS

Principio:

Es un método indirecto que, detecta productos de peroxidación lipídica, el ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) reacciona con una serie de compuestos diferentes, por lo que su reacción se denomina TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico). Dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de MDA para generar un cromóforo que se absorbe a 532-535 nm. La absorbancia del producto de reacción se refiere al aducto de MDA, 4-hidroxi-2-nonenal y acroleína (Devasagayam *et al.*, 2003).

Reacción (1):



Procedimiento:

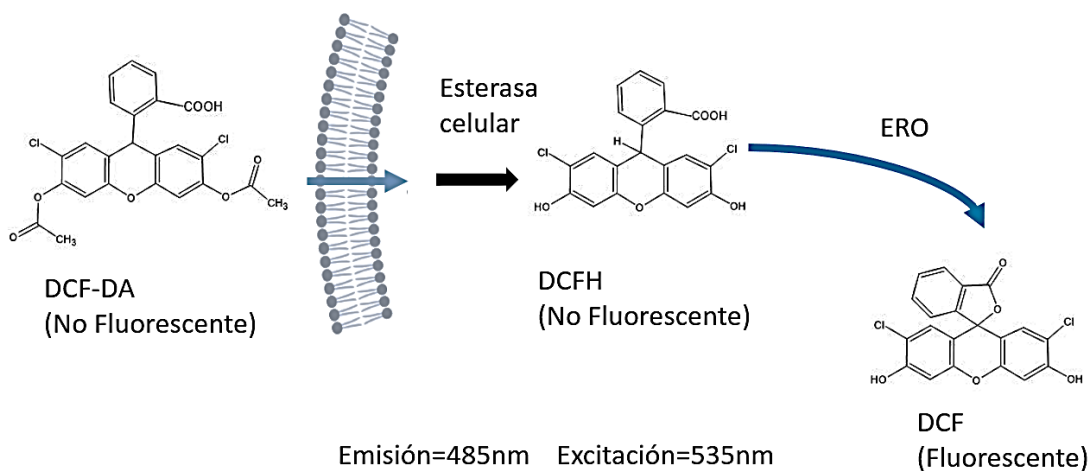
El suero y el tejido homogenizado se analizaron por duplicado. Las muestras se mezclaron con el reactivo TBA (ácido tricloroacético [TCA] –ácido tiobarbitúrico [TBA]-HCl [15%, w / v ATC; 0.375%, w / v TBA; HCl 0.25 N]). Para evitar la oxidación de la muestra y la generación de ERO por el método, se adicionó 5 μ l del antioxidante butil-hidroxi-toluenio (BHT) a una concentración de 6.25×10^{-3} g/ml. La solución se incubó durante 1 h a 50°C. A continuación, se sometió a choque térmico a 4°C por 5 min, se centrifugaron a 8,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante (250 μ l para suero y 180 μ l para el tejido homogenizado) colocándose en placa de 96 pozos sobre cama de hielo. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 532nm. Las concentraciones de TBARS de la muestra se calculó como el coeficiente de extinción de $1.56 \times 10^5 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Los datos del tejido se normalizaron con la concentración de proteínas para cada muestra (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.10.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Principio:

La 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCF-DA) es un compuesto no fluorescente que atraviesa las membranas celulares. Después es hidrolizada por las enzimas esterases intracelulares a 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH). En presencia de ERO (H_2O_2 , $OH\cdot$ y oxígeno singlete), se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es un compuesto altamente fluorescente. La fluorescencia intracelular de la DFC permite cuantificar la formación de ERO, ya que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de radicales libres producidos (Chen *et al.*, 2010).

Reacción (2):



Procedimiento:

Para este ensayo, se prepararon dos buffers de TRIS-HEPES en proporciones 18:1 y 9:1 (v/v) respectivamente. También, se preparó una solución stock para la curva estándar, en un tubo tipo Eppendorf cubierto con aluminio el cual contenía 4.0121 mg de DCF en 1 ml de metanol grado HPLC (MetOH-HPLC), los puntos de la curva se prepararon hasta el final. Para las muestras se preparó un stock de DCF-DA (4.87 mg/ 1 ml de MetOH-HPLC) cubierto de la luz, previo al análisis se hizo una dilución 1:20 (DCF-AC 2) de la cual se tomaron 600 μ l y se agregaron 5.4 ml de buffer 18:1 (DCF-AC 3).

Para este ensayo las alícuotas aisladas del homogenizado total se cubrieron totalmente de la luz. Se centrifugaron a 8,000 rpm durante 15 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante, se tomaron 5 μ l de cada muestra por duplicado y se colocaron en una placa negra de 96 pozos que se encontraba en cama de hielo. Se añadió 145 μ l del buffer 18:1 y 50 μ l de DCF-AC 3. La placa se incubó en un espectrofotómetro a una emisión de 480 nm y una extinción de 525 nm durante 1 h a 37°C. Junto con las muestras se colocaron también los puntos de la curva estándar. Los datos obtenidos se normalizaron con la concentración de proteínas para cada muestra

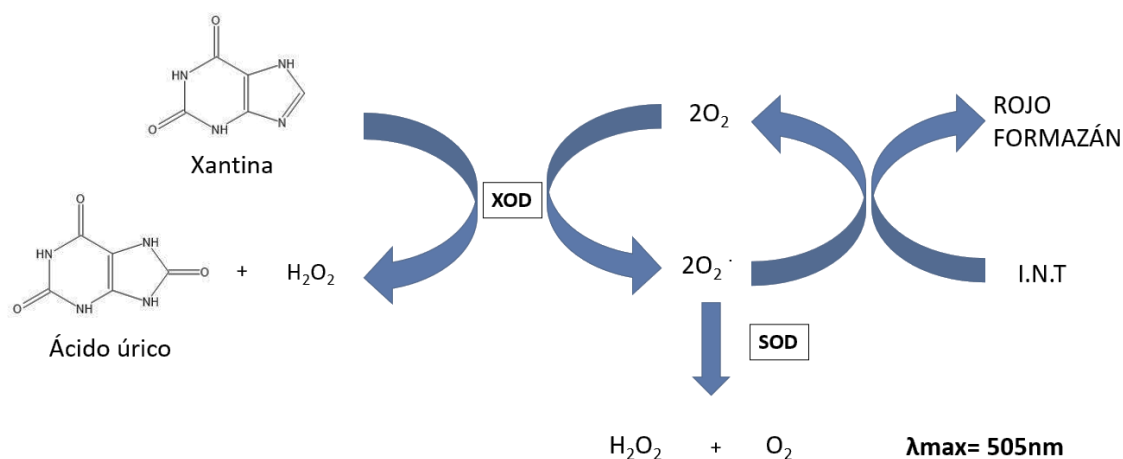
(Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.10.4 Superóxido dismutasa (SOD)

Principio:

La función de la SOD es acelerar la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$, producido durante un proceso oxidante energético, generando H_2O_2 y O_2 . Se emplea el método de Xantina-Xantina oxidasa (X-XO) para formar radicales $O_2^{\cdot-}$, los cuales reaccionan con el cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil-tetrazolio (INT), para formar el rojo de formazán. La actividad de la SOD se expresa en relación del grado de inhibición de esta reacción.

Reacción (3):



Procedimiento:

Para su medición se utilizó el estuche comercial RANSOD de RANDOX (Cat No. SD 125), reconstituyéndose los viales R1, XOD y CAL del KIT, según lo indica el inserto del mismo. Para este ensayo se tomaron alícuotas del homogenizado total de cada muestra centrifugaron a 8,000 rpm, durante 15 min a $4^{\circ}C$ para el ensayo. Se preparó una cama de hielo y se colocó la placa de 96 pozos, por duplicado $7 \mu l$ de sobrenadante y se adicionaron $250 \mu l$ de R1 y $37.5 \mu l$ de XOD. La placa se leyó

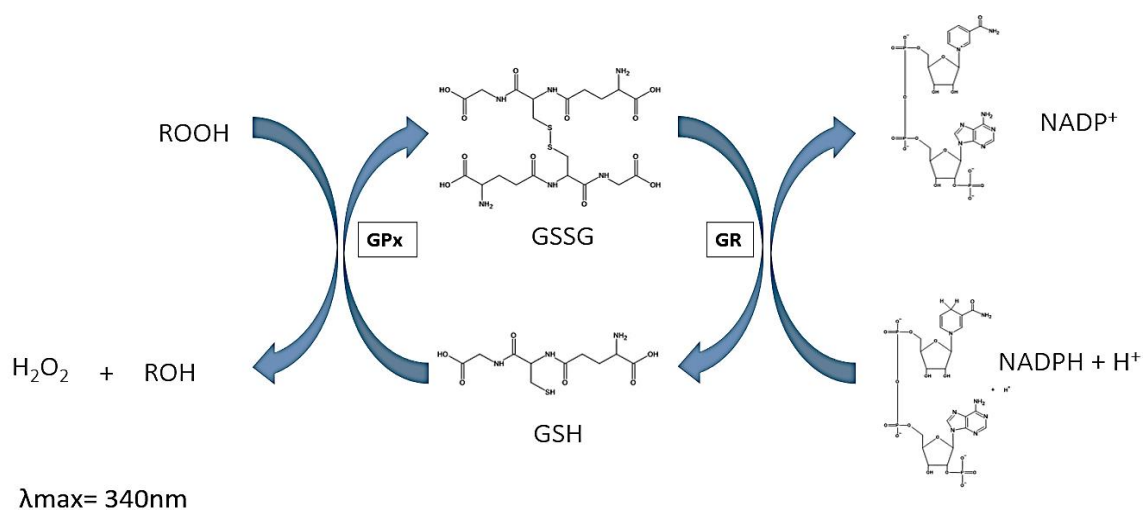
en un espectrofotómetro a 505 nm a una temperatura de 37°C durante tres minutos tomando lecturas a los 30 segundos y posteriormente cada minuto hasta los 3 minutos. Junto con las muestras, se colocaron también los puntos de la curva estándar del kit. Los datos obtenidos fueron normalizados con la concentración de proteínas de la muestra (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.10.5 Glutación peroxidasa (GPx)

Principio:

Esta enzima cataliza la oxidación del glutati6n por medio del hidr6xido de cumeno; en presencia de glutati6n reductasa y de NADPH. El glutati6n oxidado es inmediatamente convertido a su forma reducida a la par que es reducido NADPH a NADP⁺. Esta reacci6n se mide con la disminuci6n en la absorbancia del NADPH con respecto al tiempo.

Reacci6n (4):



Procedimiento:

Para determinar la GPx se utiliz6 el estuche comercial RANSEL de RANDOX (Cat. No. RS504), los viales R1 y R2 se reconstituyeron seg6n el inserto. Para este ensayo se tomaron al6cuotas del homogenizado total de cada muestra y se

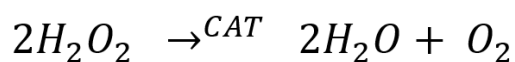
mantuvieron a en hielo, se centrifugarán a 8,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante para el ensayo se colocó en placa de 96 pozos en una cama de hielo, por duplicado se pipetearon 7 µl de sobrenadante y se adicionaron 350 µl de R1 y 14 µl de R2. La placa se incubó a 37°C en un espectrofotómetro a 340 nm durante 3 min. Las lecturas se tomarán al tiempo cero, 1, 2 y 3 min (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.10.6 Catalasa (CAT)

Principio:

La CAT cataliza la descomposición del peróxido de H₂O₂ en agua y O₂. Este método se basa en la medición del sustrato H₂O₂ que queda después de la acción de la catalasa (Aebi, 1984).

Reacción (5):



$\lambda_{max} = 240nm$

Procedimiento:

Se preparó un stock madre (1) de H₂O₂: 100 µl de H₂O₂ [301.3 mM] y 99.9 ml de agua bidestilada (MilliQ) para una concentración final de 0.3 mM, y un buffer de fosfato potásico (KPBS) 0.2 M y pH de 7.0, preparado con agua bidestilada (MilliQ), ambos preservados en hielo. Posteriormente se realizó el medio de reacción (MRe), con 4 ml del stock 1 y 96 ml de KBPS para una concentración final de 12 µM de H₂O₂. Para este ensayo se tomaron 50 µl del homogenizado total de cada muestra y se colocaron a 4°C, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, al tiempo se colocó una placa de 96 pozos sobre cama de hielo, por duplicado se pipetearon 10 µl del sobrenadante adicionando 250 µl de

MRe. La placa se leyó en un espectrofotómetro a 240 nm a TA por 3 min tomado lecturas a los 30 segundos, 1, 2 y 3 min. Los datos se calcularon con la fórmula:

$$\text{Actividad de catalasa} = \frac{\Delta \text{abs} * \text{dil} * (\text{Vol total}/\text{Vol de muestra})}{\xi * \text{Proteína}}$$

donde ξ coeficiente de extinción molar ($\xi = 39.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los datos obtenidos fueron normalizados con la concentración de proteína para cada muestra (Rodríguez-González *et al.*, 2015; Rodríguez-González *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2015).

7.11 Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)

El RNA total fue aislado de las regiones cerebrales a analizar (Hipocampo y CPF) de acuerdo con las instrucciones del reactivo TRIzol (Invitrogen™). El ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa de ARN total tratado con ADNasa (1–3 μg) con el Kit de Transcriptor de síntesis de ADNc de cadena simple (Roche Diagnostics Cat. No. 04 379 012 001). El análisis de PCR cuantitativo se realizó empleando el instrumento LightCycler® 480 Instrument II, 96-well qPCR en tiempo real de Roche (Cat. No. 05 015 278 001). Fue medida la expresión génica de las enzimas antioxidantes (SOD-1, GPx-4 y CAT), así como el receptor a glucocorticoides (RG). La lista de secuencias de cebadores utilizadas para el análisis de RT-PCR en este estudio se muestra en la Tabla 5. Los resultados fueron normalizados a la expresión de L32 utilizando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Castro-Rodríguez *et al.*, 2020).

Tabla 5. Cebadores utilizados en análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)

GEN	SECUENCIA DIRECTA	SECUENCIA REVERSA
L-32	5'-GCTGCCATCTGTTTTACGG-3'	5'-TGACTGGTGCCTGATGAACT-3'
SOD-1	5'-GGTCCAGCGGATGAAGAG-3'	5'-GGACACATTGGCCACACC-3'
GPx-4	5'-TGGGAAATGCCATCAAATG-3'	5'-CGGCAGGTTCTCTATCA-3'
CAT	5'-AATGAAGACAACGTCACTCAGG-3'	5'-TGTTCTCACACAGGCGTTTC-3'
RG	5'-GTGCTGACATGTGGAAGCTG-3'	5'-CAATCGTTTCTTCCAGCACA-3'

8. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar (EE), con 10 animales (n=10) por grupo experimental (dieta). Los niveles de significancia se consideraron con un valor $p \leq 0.05$. La normalidad y homocedastidad fueron evaluados por la prueba de Kolmogorv-Smirnov y Levene respectivamente.

El análisis se realizó utilizando el software de SigmaStat 3.5. Los datos fueron comparados con la prueba estadística de t-student (datos paramétricos), en caso de que los datos no pasen prueba de normalidad se utilizó la prueba U de Mann Whitney (no paramétrica).

Para un análisis más completo, se realizó una correlación entre los parámetros oxidantes, distribución grasa y concentraciones de hormonas esteroides usando la correlación de Pearson (de no pasar la prueba de normalidad se realizó una correlación de Spearman). Estos datos fueron presentados como una matriz de correlación donde el color azul y su intensidad indican correlaciones positivas (directamente proporcionales), y el color rojo y su intensidad indican relaciones negativas (inversamente proporcionales).

9. Resultados

9.1 Ganancia de peso

En la Figura 5, se muestra la ganancia de peso corporal semanal de las crías macho durante 20 semanas a partir del destete (21 días). Al inicio del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales [$t=-0.8$, $p=0.83$; DC: 65.3 ± 0.9 g; DAGAF: 68 ± 3.3 g]. Sin embargo, a partir de la cuarta semana hasta el final del estudio el grupo DAGAF mostró una ganancia de peso mayor en comparación con el grupo DC. En la semana 20, final del experimento, el grupo DAGAF fue estadísticamente diferente con respecto al Control [UMW=8, $p=0.002$; DC: 630.4 ± 16.1 g; DAGAF: 722 ± 18.4 g].

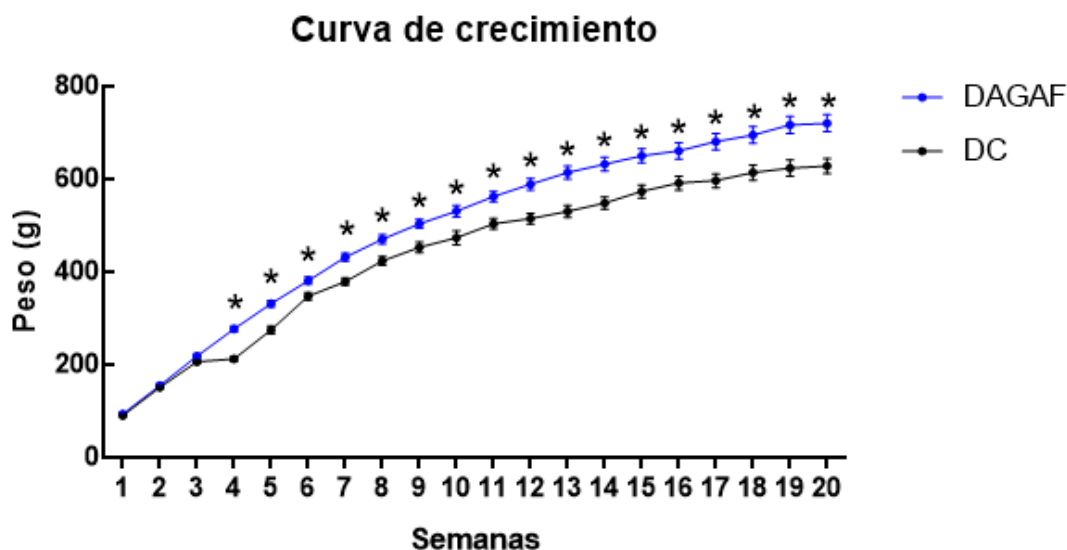


Figura 5. Ganancia de peso de ratas macho alimentadas con DC y DAGAF, desde el destete hasta el final del experimento (edad 21d-161d). Datos expresados como media \pm EE, DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05$ * vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.2 Ingesta de alimento y calórica

En la Figura 6, se muestra la ingesta diaria, que se realizó durante 12 días previos a finalizar el estudio, donde se muestra que el grupo DAGAF tuvo una ingesta menor que el grupo DC en todos los días evaluados [$p < 0.0001$; DC: 37.17 ± 3.2 g; DAGAF: 23.89 ± 0.3 g], reflejándose este mismo comportamiento en la ingesta total (Figura 7A) [$t=0.7$, $p < 0.0001$; DC: 446 ± 13.5 g; DAGAF: 286.7 ± 9.1 g]. En la Figura 7B se

ilustra el consumo calórico total por rata para los dos grupos, se observa que el grupo DAGAF, al igual que en los resultados previos, tuvo una ingesta calórica menor [$F_{(3.855, 69.39)} = 4.606$, $p=0.002$; DC: 1375 ± 34.49 kcal; DAGAF: 1147.1 ± 18.26 kcal].

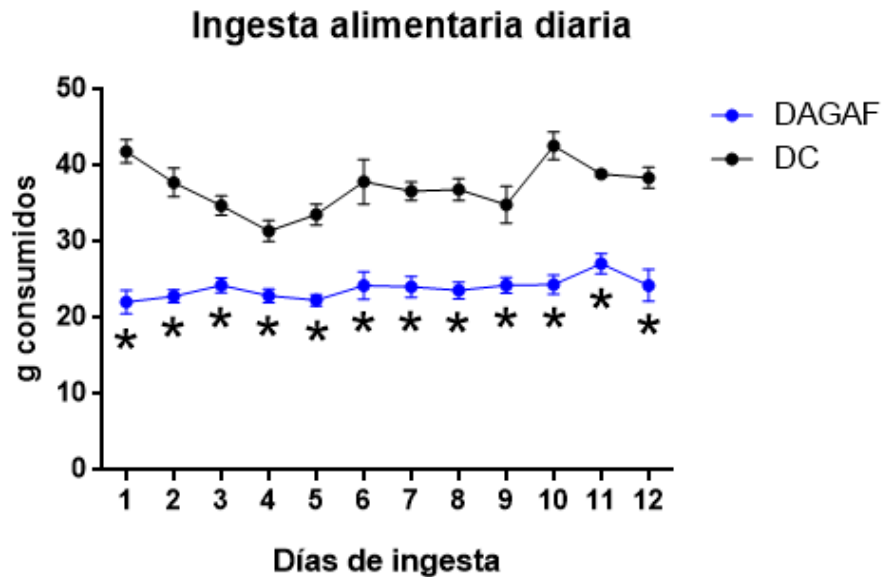


Figura 6. Ingesta diaria (12 días) de los grupos DC y DAGAF. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05$ * vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

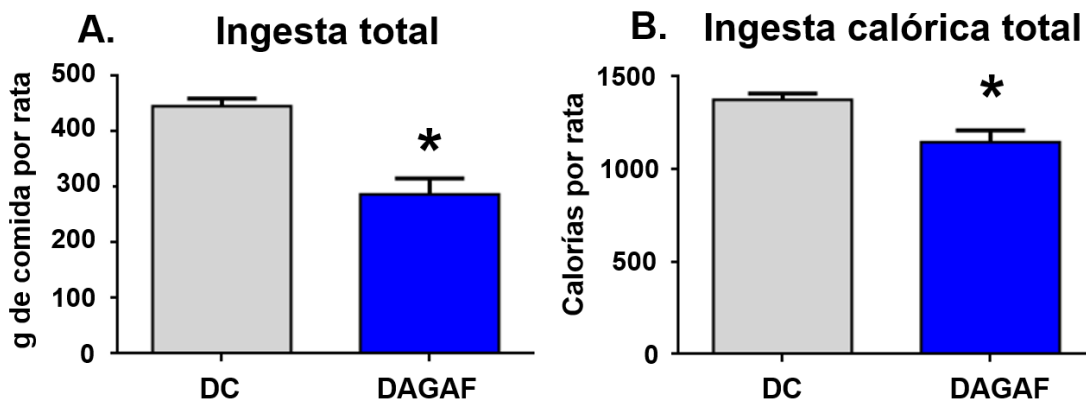


Figura 7. Ingesta alimenticia y calórica total de los grupos DC y DAGAF (edad: 161d-172d). A) Ingesta alimenticia total, gramos de alimento ingeridos por rata durante 12 días. B) Ingesta calórica por gramo de dieta total, calorías ingeridas por rata durante 12 días. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05$ * vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.3 Evaluación de memoria

La evaluación de memoria de reconocimiento (RON/RNL) se llevó a cabo en 5 fases: habituación (3 d), familiarización, memoria a corto plazo (2 h), memoria a largo plazo (24 h) y memoria a largo plazo tardía (7d). En la Figura 8, se muestra los resultados obtenidos de a fase de habituación, en la cual no se observaron diferencias en la distancia recorrida entre los dos grupos [$F_{(1.703, 30.66)} = 0.4$; **Día 1:** $p=0.96$; DC: 21.58 ± 2.5 m; DAGAF: 20.45 ± 1.8 m; **Día 2:** $p=0.90$; DC: 19.1 ± 2.2 m, DAGAF: 21.0 ± 2.5 m; **Día 3:** $p=0.8$; DC: 22.2 ± 4.2 ; DAGAF: 18.6 ± 1.4]. Durante la fase de familiarización (Figura 9), en la cual se presentaron dos objetos idénticos (Objeto A y A'), no hubo preferencia por ninguno de los dos objetos en ambos grupos [$t=1.4$, $p=0.3$; DC: Objeto A: 14.5 ± 2.0 , Objeto A': 18.5 ± 3.3 ; $t=0.3$, $p=0.7$; DAGAF Objeto A: 30 ± 3.8 , Objeto A': 31.9 ± 3.5].

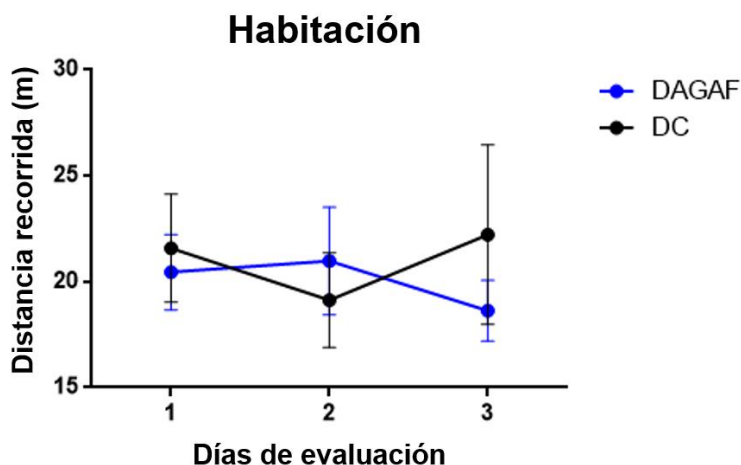


Figura 8. Evaluación de la fase de habituación de los grupos DC y DAGAF (edad: 161d-163d): campo abierto. Distancia recorrida (m). Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

A. Familiarización

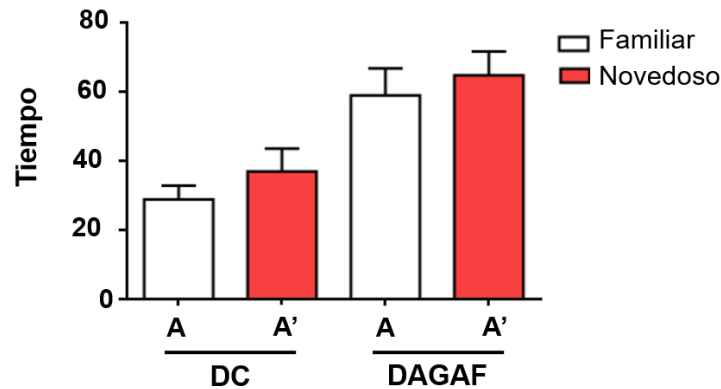


Figura 9. Fase de familiarización o etapa de entrenamiento en donde se presentaron dos objetos iguales a las ratas experimentales. Tiempo de interacción del grupo DC y DAGAF (edad: 164d) con cada objeto. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

Los resultados de la fase de memoria a corto plazo se muestran en la Figura 10. Se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo de interacción con el objeto novedoso de nueva localización (objeto B) en el grupo DC, sin cambios en el DAGAF [DC: UMW=21, $p=0.01$; Objeto A': 21.6 ± 4.1 vs Objeto B: 36 ± 3.5 ; DAGAF: $t= 0.3$, $p=0.7$; Objeto A': 52.17 ± 8.2 vs Objeto B: 478.87 ± 7.4] (Figura 10A). De igual manera, el índice de discriminación [$t= 2.3$, $p=0.02$; DC: 0.31 ± 0.1 ; DAGAF: -0.03 ± 0.1] y el índice de reconocimiento [$t=2.3$, $p=0.02$; DC: 0.65 ± 0.05 ; 0.48 ± 0.05] fueron menores en el grupo DAGAF (Figura 10B y 10C).

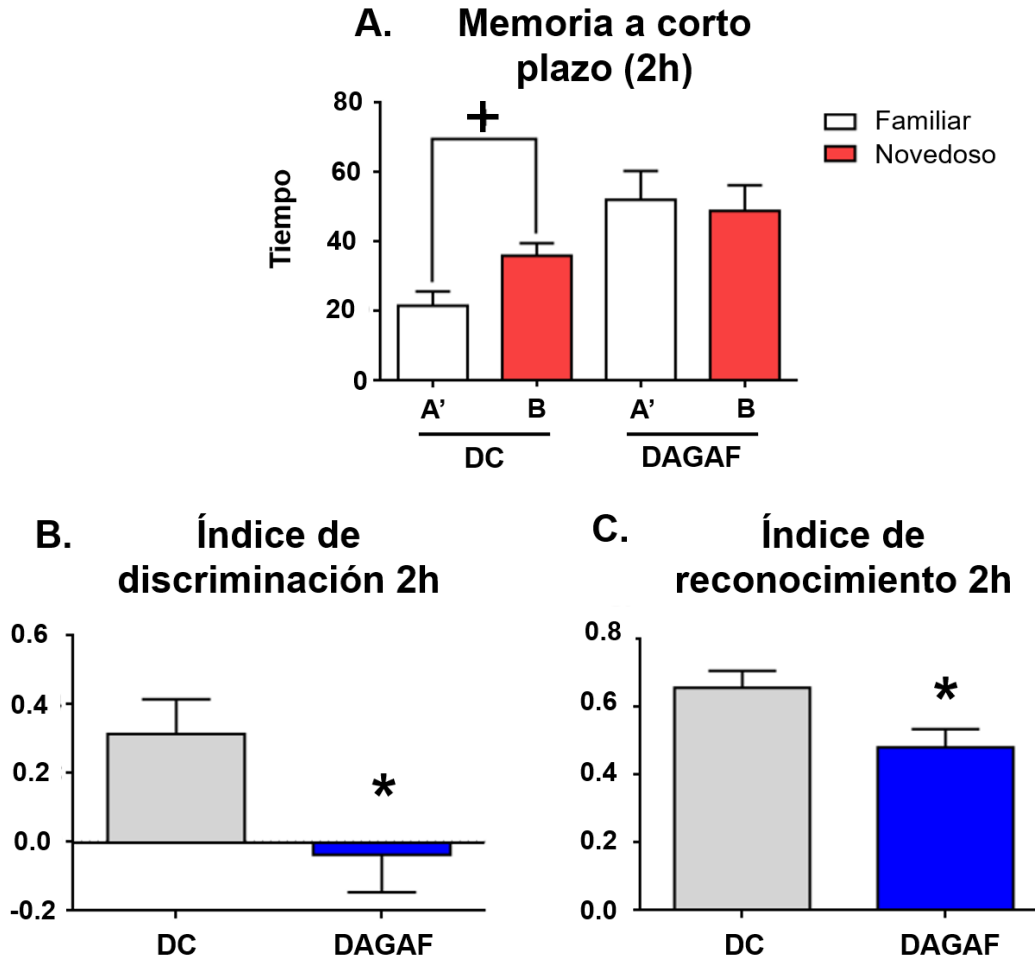


Figura 10. Fase de evaluación de memoria de corto plazo de los grupos DC y DAGAF (edad: 164d). A) Tiempo de interacción con cada objeto. B) Índice de discriminación. C) Índice de reconocimiento. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^+$ vs objeto familiar; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

En la Figura 11, se muestran los resultados de la evaluación de la memoria a largo plazo temprano. El tiempo de interacción con los objetos se muestra en la Figura 11A, mostrándose en el grupo DC mayor preferencia por el objeto novedoso con nueva localización (objeto C) [$t=3.5$, $p=0.002$; Familiar: 27.5 ± 3.8 vs Novedoso: 45.7 ± 3.5], sin cambios en el grupo DAGAF [$t=1$, $p=0.3$; Familiar: 53.1 ± 5.5 vs Novedoso: 45.4 ± 5.2]. El índice de discriminación (Figura 11B) fue menor en el grupo DAGAF en comparación al DC [$t=3.9$, $p=0.001$; DC: 0.26 ± 0.05 ; DAGAF: -0.07 ± 0.06]. Este mismo comportamiento se mantuvo en el índice de reconocimiento [$t=3.9$, $p=0.0008$; DC: 0.63 ± 0.02 ; DAGAF: -0.46 ± 0.03].

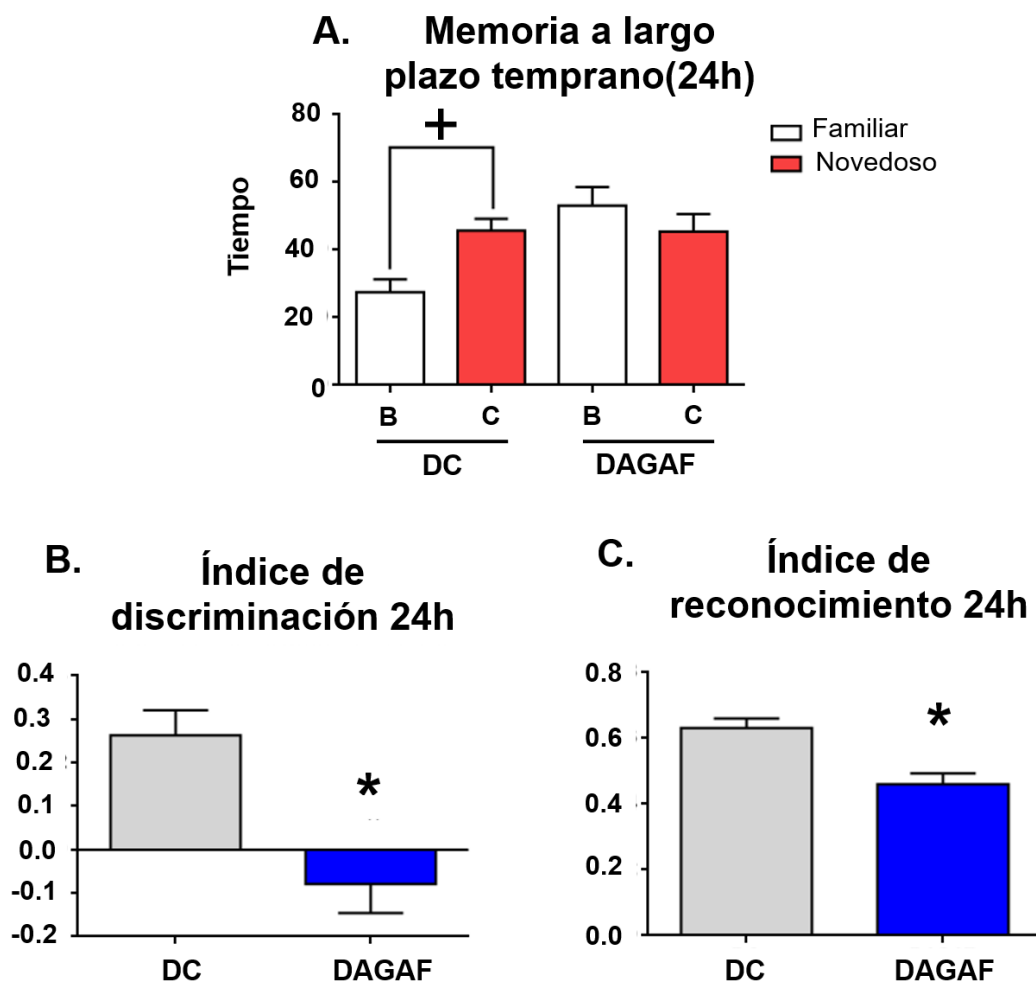


Figura 11. Fase de evaluación de memoria de largo plazo temprano de los grupos DC y DAGAF (edad: 165d). A) Tiempo de interacción con cada objeto. B) Índice de discriminación. C) Índice de reconocimiento. Datos expresados como media \pm EE.; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^+$ vs objeto familiar; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

En la Figura 12, se muestran los resultados de la evaluación de la memoria a largo plazo tardía. El tiempo de interacción con los objetos se muestra en la Figura 12A, mostrándose en el grupo DC mayor preferencia por el objeto novedoso con nueva localización (objeto D) [$t=2.6$, $p=0.01$; Familiar: 27.2 ± 4 vs Novedoso: 44.2 ± 5], sin preferencia por algún objeto en el grupo DAGAF [$t=1.1$, $p=0.2$; Familiar: 46.08 ± 6.7 vs Novedoso: 35.9 ± 6]. El índice de discriminación (Figura 12B) muestra que el grupo DAGAF fue menor en comparación con DC [$t=2.7$, $p=0.01$; DC: 0.22 ± 0.09 ; DAGAF: -0.15 ± 0.09]. Este mismo comportamiento se mantuvo en el índice de reconocimiento (Figura 12C) [$t=2.7$, $p=0.01$; DC: 0.61 ± 0.04 ; DAGAF: 0.42 ± 0.04].

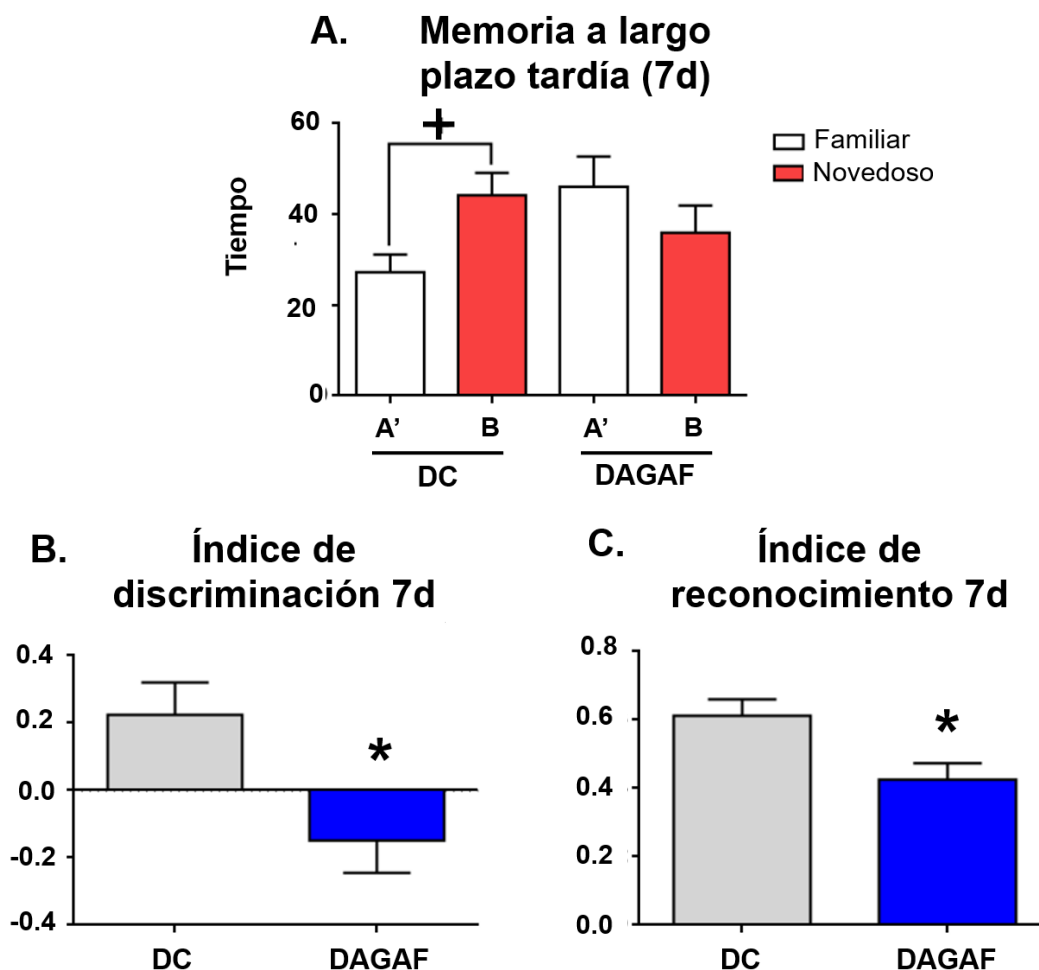


Figura 12. Fase de evaluación de memoria de largo plazo tardía de los grupos DC y DAGAF (edad: 172d). A) Tiempo de interacción con cada objeto. B) Índice de discriminación. C) Índice de reconocimiento. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^+$ vs objeto familiar; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.4 Composición corporal por resonancia magnética (RM)

Al término de la evaluación de memoria de reconocimiento, se realizó una medición de composición corporal por RM a los animales. La Figura 13 muestra los resultados obtenidos, previo a la medición por RM las ratas fueron pesadas, el peso del grupo DAGAF (Figura 13A), fue significativamente mayor con respecto al DC [$t=3.4$, $p=0.003$; DC: 630.6 ± 16.15 ; DAGAF: 718.6 ± 20.13]. El porcentaje de tejido graso (Figura 13B) fue mayor en el grupo DAGAF con respecto al DC [$t=4.8$, $p=0.0002$; DC: 22.33 ± 1.2 ; DAGAF: 30.22 ± 1]. Mientras que el porcentaje de tejido magro en

el grupo DAGAF tuvo un comportamiento inverso, siendo menor que en el grupo DC [t=3.6, p=0.002; DC: 66.35 ± 2.1; DAGAF: 56.52 ± 1.4]

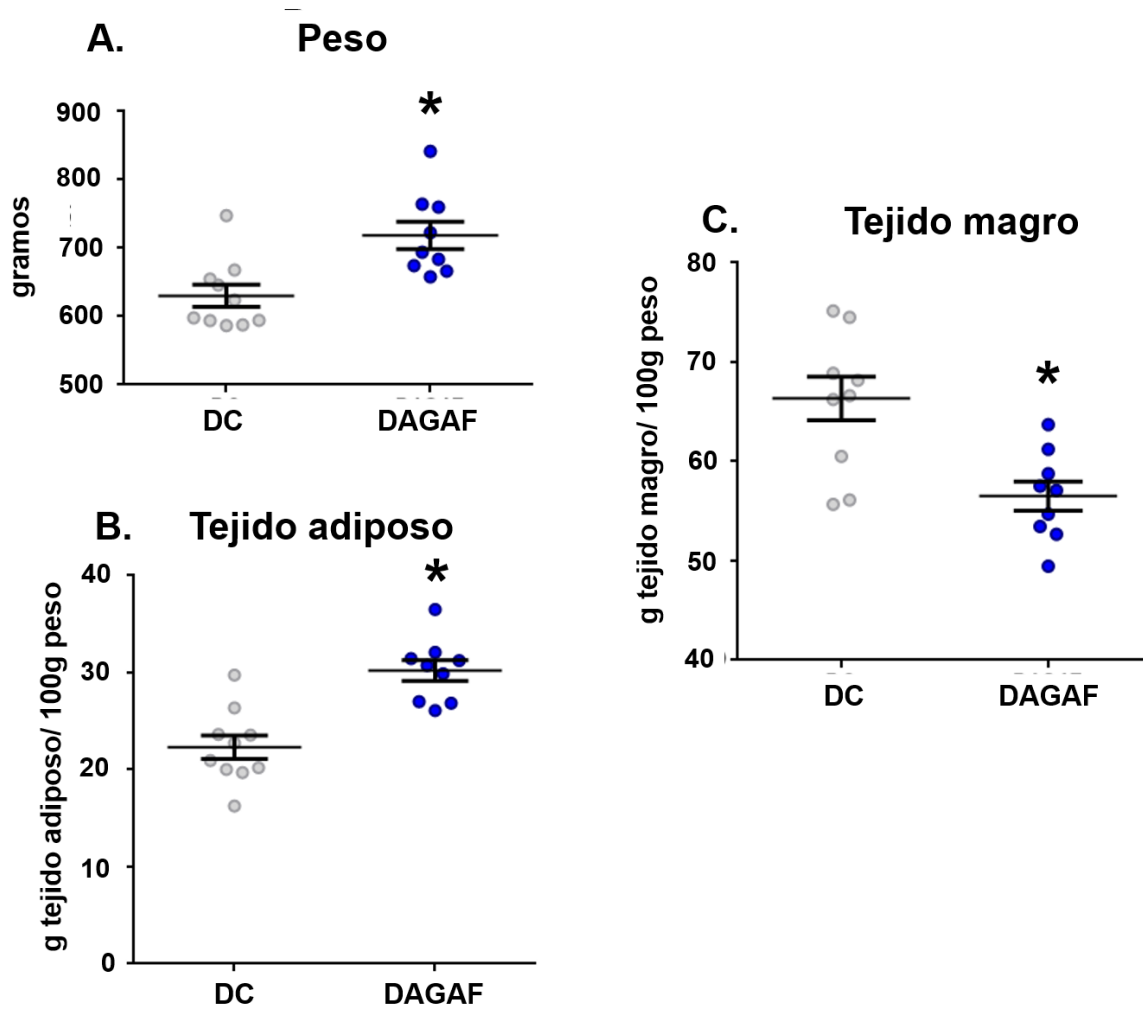


Figura 13. Resultados de RM ratas macho alimentadas con dieta DC y DAGAF (173d). A) Peso corporal B) % tejido graso. C) % tejido magro. Datos expresados como media ± EE; DC n=10, DAGAF n=10; p <0.05* vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. RM: resonancia magnética.

9.5 Peso corporal, grasa total e índice de adiposidad

La Figura 14, muestra el peso corporal, grasa total e índice de adiposidad (IA) al día de la eutanasia. En la Figura 14A, se observa que el grupo DAGAF tuvo un peso mayor con respecto al grupo DC [t=3.9, p=0.001; 663.7 ± 17.6; DAGAF: 765.7 ± 20.0]. La grasa total (Figura 14B) en el grupo DAGAF fue mayor [t=4.1, p=0.0007;

DC: 59.5 ± 5.6 ; DAGAF: 89.9 ± 4.7]. Por último, el IA se muestra en la Figura 14C, fue estadísticamente mayor en el grupo experimental que en el DC [$t=3.8$, $p=0.001$; DC: 8.848 ± 0.6 ; DAGAF: 11.71 ± 0.4463].

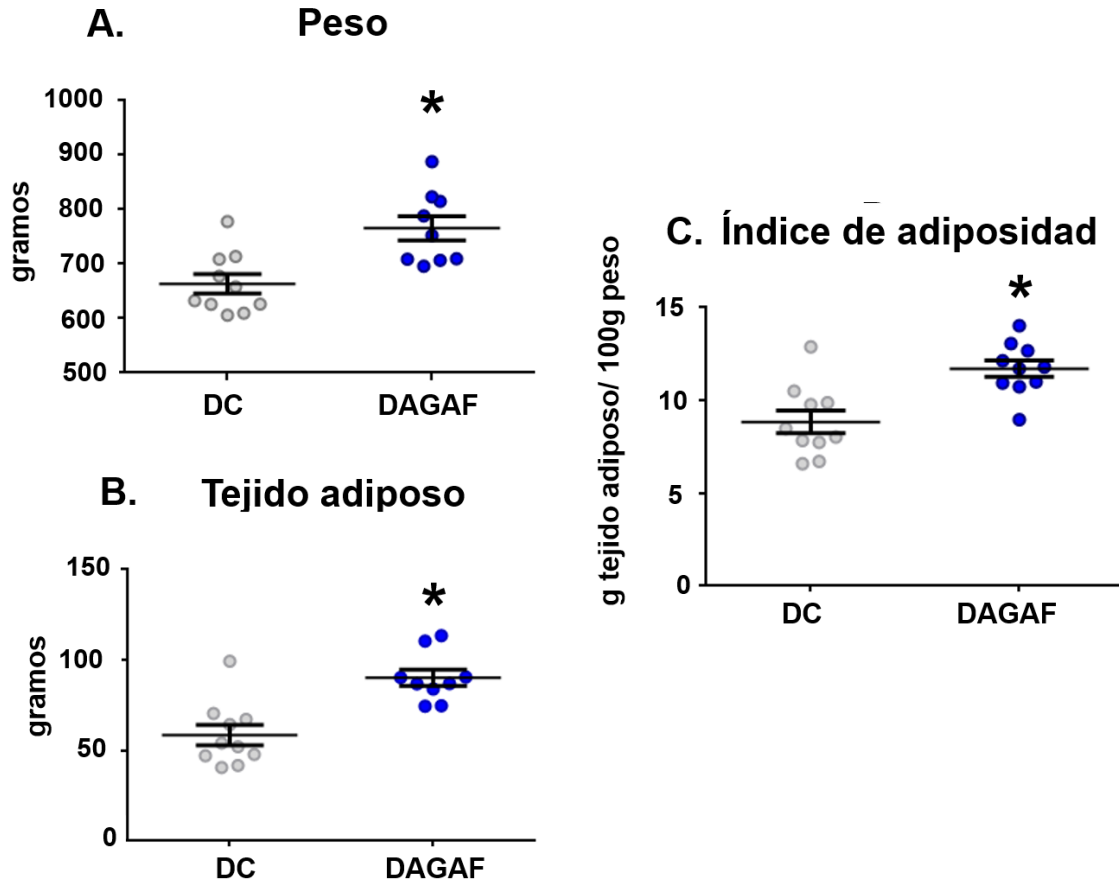


Figura 14. Mediciones morfométricas de grupos DC y DAGAF. A) Peso B) Grasa total C) Índice de adiposidad. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

La Tabla 6, muestra la distribución de la grasa de los grupos experimentales, es decir el peso de cada región al día de la eutanasia. Se observa que el peso de las grasas del grupo DAGAF en fue mayor en comparación con el grupo DC (grasa retroesternal [UMW=10, $p=0.001$], grasa retroperitoneal [$t=4.3$, $p=0.0005$], gonadal [$t=3.2$, $p=0.001$] y mesentérica [UMW=2, $p=0.03$]) a expencion de la peripancreática [$t=2.1$, $p=0.048$]).

Tabla 6. Distribución de grasa extraída durante la disección de grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d).

	DC	DAGAF
Grasa retroesternal (g)	0.88 ± 0.2	1.8 ± 0.3 *
Grasa retroperitoneal (g)	26.7 ± 2.6	45.3 ± 3.4 *
Grasa gonadal (g)	18.8 ± 1.8	25.5 ± 0.9 *
Grasa mesentérica (g)	8.9 ± 1.0	11.7 ± 0.6 *
Grasa peripancreática (g)	4.0 ± 0.4	5.5 ± 0.5

Los datos se presentan en medias ± EE; DC n=10, DAGAF n=10; p <0.05* vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. g: gramos.

9.6 ACTH y corticosterona

En la Figura 15 se muestra la concentración sérica de ACTH y corticosterona en ambos grupos. El análisis con t-student, mostró un incremento en el grupo DAGAF de la concentración sérica de ACTH [UMW=8, p=0.002; DC: 229.2 ± 23.9; DAGAF: 443.8 ± 53.8], así como de corticosterona [t=3.9, p=0.002; DC: 191.6 ± 16.5; DAGAF: 427.5 ± 62.6] con respecto al DC.

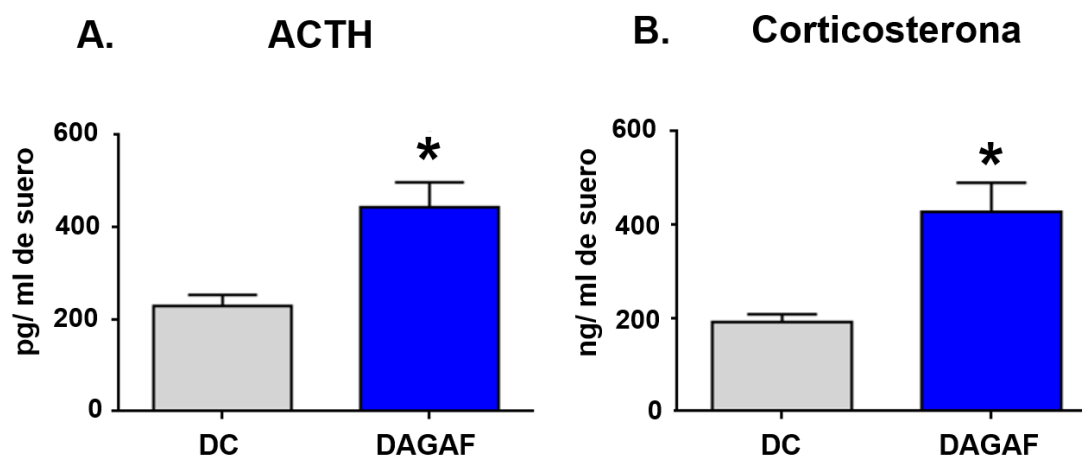


Figura 15. Hormonas del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal de grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). A) Concentración de ACTH (pg/ml). B) Concentración de corticosterona (ng/ml). Datos expresados como media ± EE; DC n=10, DAGAF n=10; p <0.05* vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. pg: picogramos. ng: nanogramos. ml: mililitros

9.7 Biomacadores de estrés oxidante

9.7.1 Concentración de TBARS en suero

El grupo DAGAF presentó una concentración mayor de TBARS por con respecto a la DC [$t=2.7$, $p=0.02$; DC: 208.8 ± 13.1 ; DAGAF: 356.1 ± 53.1], como se observa en la Figura 16.

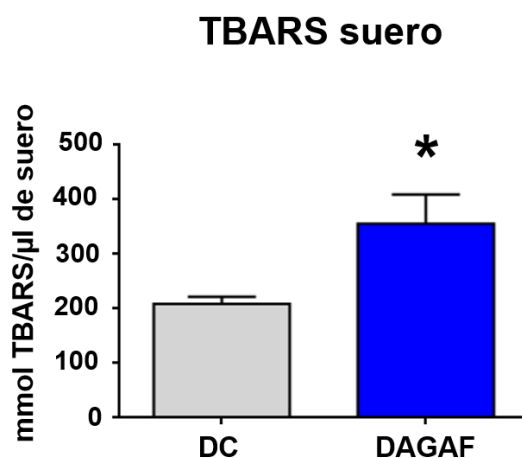


Figura 16. Concentración de TBARS en suero de grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d) expresados en nmol de TBARS/100μl. Datos expresados como media \pm EE; DC n=10, DAGAF n=10; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. TBARS: sustancias reactivas a acido tiobarbiturico. nmol: nanomoles.

9.7.2 TBARS en hipocampo y corteza prefrontal (CPF)

La Figura 17 muestra concentración de TBARS en tejido cerebral, en el grupo DAGAF fue mayor significativamente comparado con lo obtenido en el grupo DC, [$t=4.4$, $p=0.0008$; DC: 14.96 ± 1.1 ; DAGAF: 22.19 ± 1.1 ; para hipocampo (Figura 17A) y [$t=2.6$, $p=0.004$; DC: 69.92 ± 2.7 ; DAGAF: 99.25 ± 10.8 para CPF (Figura 17B)].

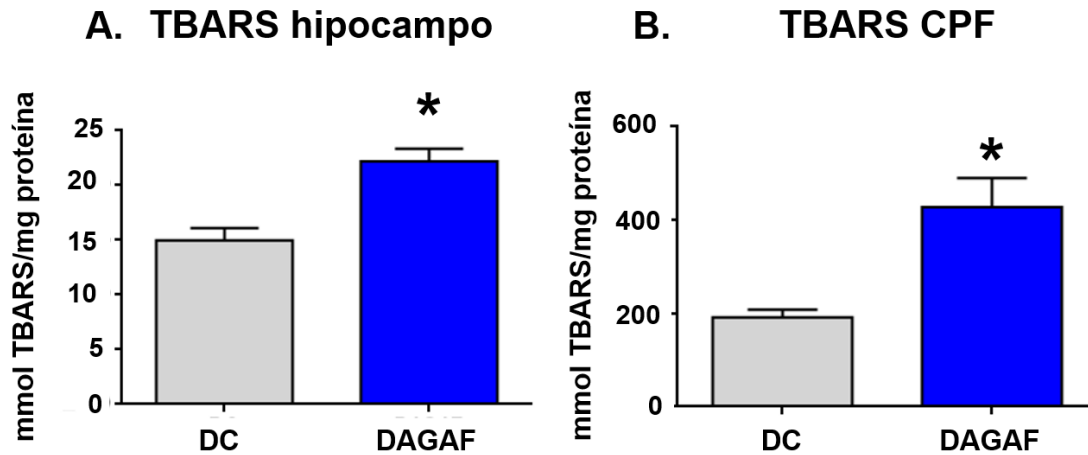


Figura 17. Concentración de TBARS hipocampo (A) y CPF (B) de grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). Datos expresados como media \pm EE; DC n=7, DAGAF n=7; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. nmol: nanomoles. mg: miligramos.

9.7.3 Especies reactivas de oxígeno en hipocampo y CPF

Los resultados de la determinación de la concentración de ERO en hipocampo, se presentan en la Figura 18A, donde se observó un incremento significativo en el grupo DAGAF con respecto al grupo DC [$t=3.3$, $p=0.004$; DC: 11.61 ± 1.1 ; DAGAF: 17 ± 0.9]. Del mismo modo la concentración de ERO en la CPF (Figura 18B) fue mayor en el grupo DAGAF que el en grupo DC [$t=6.6$, $p < 0.0001$; DC: 5.82 ± 0.5 ; DAGAF: 10.40 ± 0.5].

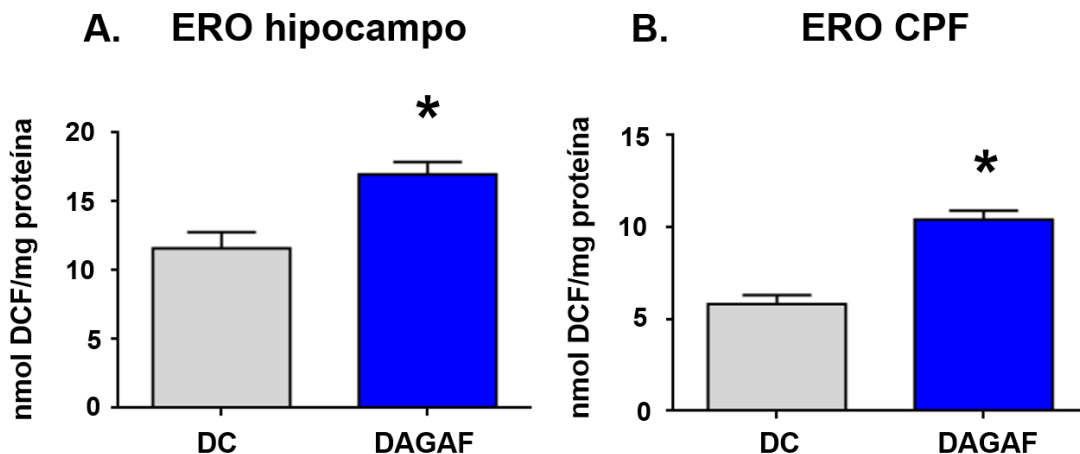


Figura 18. Concentración de ERO en hipocampo (A) y CPF (B) de los grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). Datos expresados como media \pm EE; DC n=7, DAGAF n=7; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. nmol: nanomoles. mg: miligramos. ERO: especies reactivas de oxígeno.

9.7.4 Enzimas antioxidantes hipocampo

El análisis de la actividad antioxidante en hipocampo se muestra en la Figura 19. La actividad de las enzimas SOD [$t=2.3$, $p=0.04$; DC: 19.38 ± 1.1 ; DAGAF: 24.36 ± 1.8] y GPx [$t=4.6$, $p=0.003$; DC: 22.39 ± 0.96 ; DAGAF: 44.98 ± 4.8] se elevó significativamente en el grupo DAGAF con respecto al grupo control (Figura 19A y B). Sin embargo, la catalasa [$t=0.1$, $p=0.9$; DC: 1.10 ± 0.19 ; DAGAF: 1.14 ± 0.24] no mostró cambios entre ambos grupos experimentales (Figura 19C).

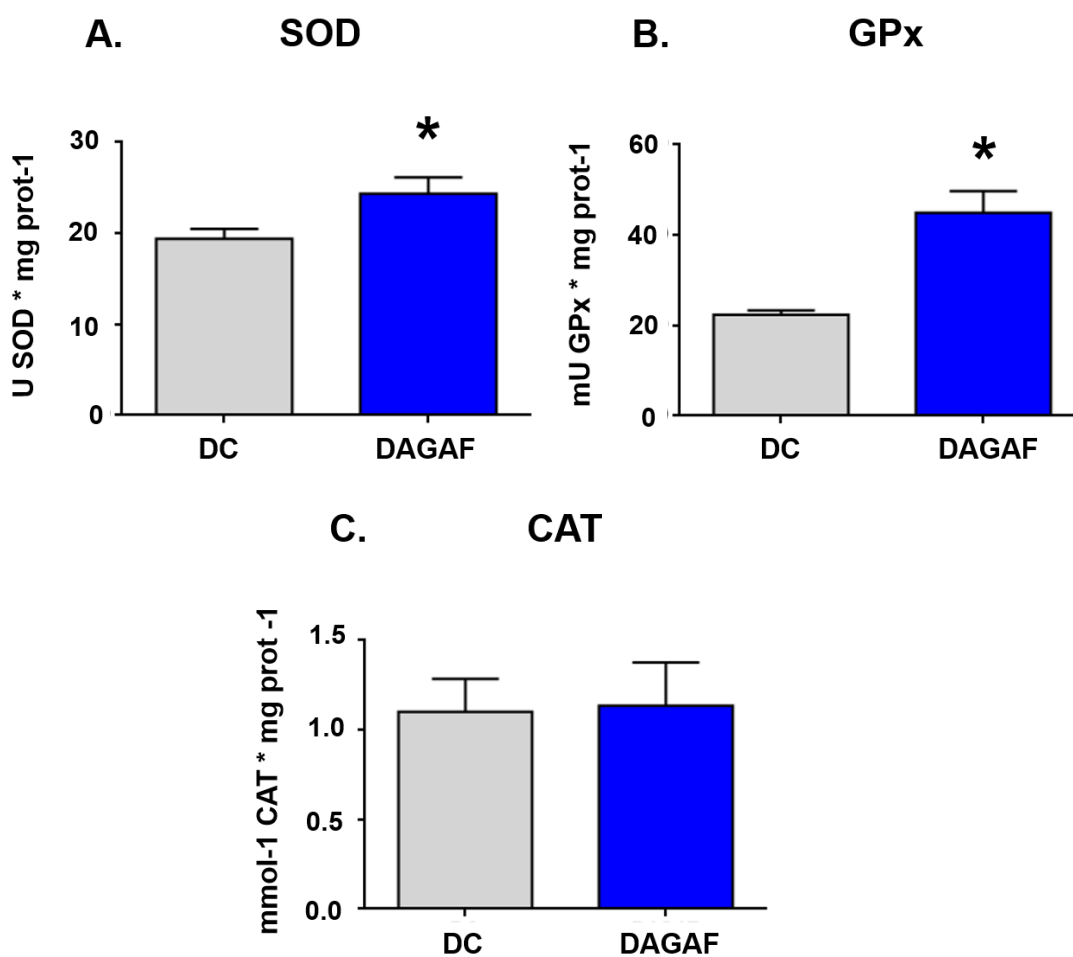


Figura 19. Actividad de enzimas antioxidantes en hipocampo de grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). A) SOD B) GPx C) CAT. Datos expresados como media \pm EE; DC n=7, DAGAF n=7; $p < 0.05$ * vs DC. DC: dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. SOD: superóxido dismutasa. GPx: glutatión peroxidasa.

9.7.5 Enzimas antioxidantes CPF

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT en CPF (Figura 20), fue mayor significativamente en el grupo DAGAF que el grupo DC [SOD: $t=2.3$, $p=0.04$; DC: 14.40 ± 1.17 ; DAGAF: $t=20.45 \pm 2.368$; GPx: $t=3.8$, $p=0.006$; DC: 23.14 ± 1.068 ; DAGAF: 36.12 ± 3.229 ; CAT: $t=2$, $p=0.04$; DC: 0.62 ± 0.08 ; DAGAF: 1.10 ± 0.2236].

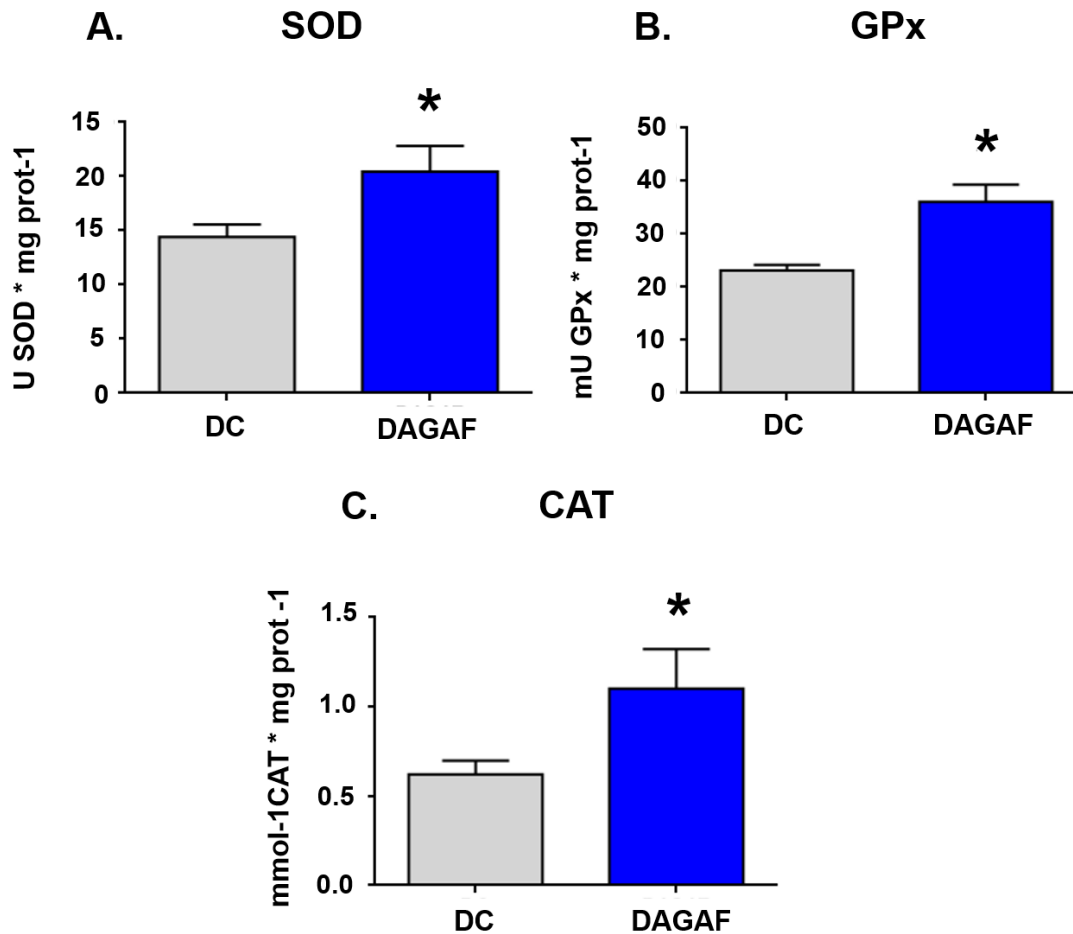


Figura 20. Actividad de enzimas antioxidantes en CPF de los grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). A) SOD. B) GPx. C) CAT. Datos expresados como media \pm EE; DC n=7, DAGAF n=7; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.8 Expresión génica

9.8.1 Expresión génica hipocampo

La expresión de SOD-1 y CAT fue elevada en el grupo DAGAF [**SOD-1**: UMW=0, $p=0.0002$; DC: 1 ± 0.34 ; DAGAF: 8.3 ± 1.3 ; **CAT**: $t=2.4$, $p=0.04$; DC: 1 ± 0.08 ; DAGAF: 17.4 ± 2.8] (Figura 22A y C). Mientras que la expresión de GPx-4 normalizada con la de L-32 no tubo diferencias entre los dos grupos [$t=0.3$, $p=0.75$; DC: 1 ± 0.07 ; DAGAF: 1.04 ± 0.11] (Figura 22B). Por último, en la figura 22D se grafica la expresión génica para RG [UMW=4, $p=0.01$; DC: 1 ± 0.1 ; DAGAF: 2.08 ± 0.3], encontrándose un incremento en DAGAF con respecto a DC.

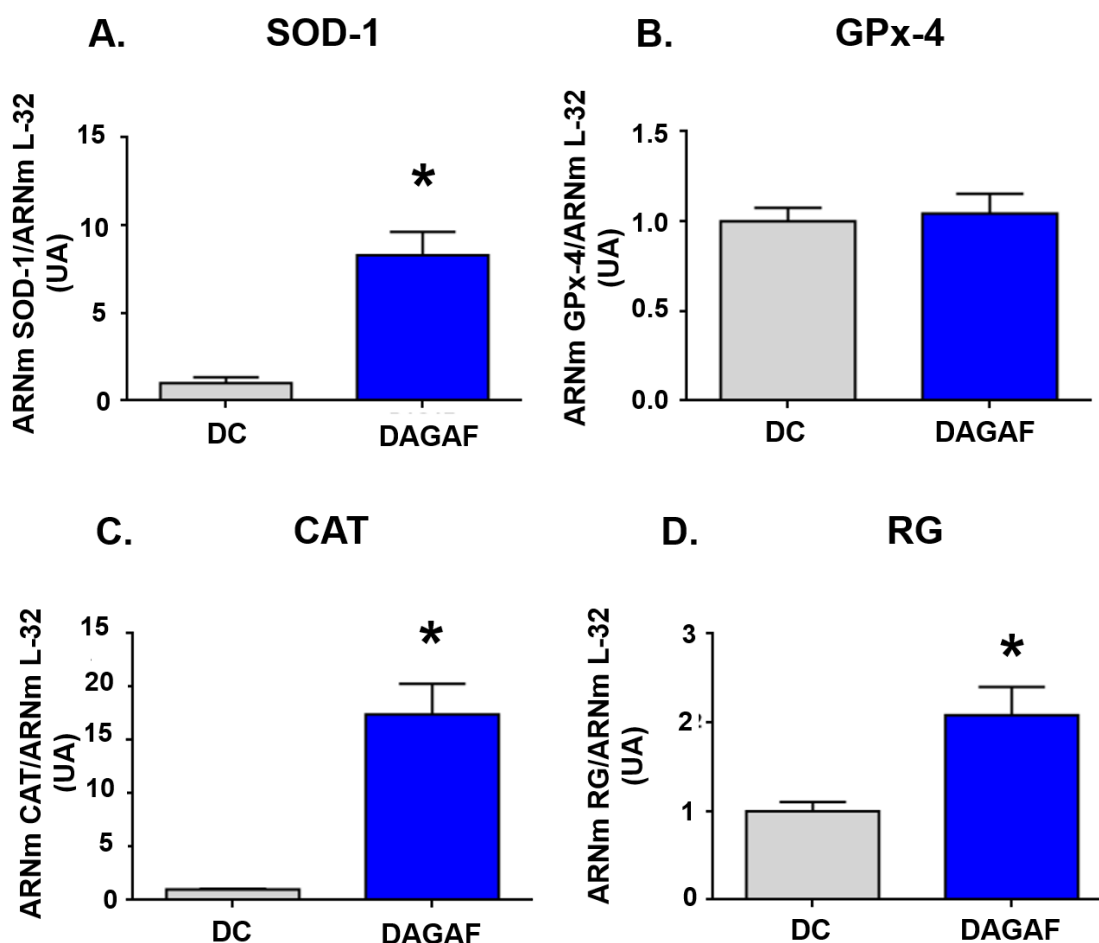


Figura 21. Expresión génica de hipocampo normalizada a la expresión de L32 utilizando el método $\Delta\Delta C_t$, de los grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). A) SOD-1. B) GPx-4. C) CAT. D) RG. Datos expresados como media \pm EE; DC n=8, DAGAF n=8; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.8.2 Expresión génica CPF

A diferencia del hipocampo, la expresión de SOD-1 y GPx-4 en CPF esta disminuida con respecto al grupo DC [**SOD-1**: $t=3.9$, $p=0.001$; DC: 1 ± 0.04 ; DAGAF: 0.7 ± 0.05 ; **GPx-4**: $UMW=0$, $p=0.0002$; DC: 1 ± 0.1 ; DAGAF: 0.9 ± 0.02] (Figura 23A y B); pero la expresión de CAT en CPF, al igual que en hipocampo, fue elevada en el grupo DAGAF [$t=4.3$, $p=0.003$; DC: 1 ± 0.04 ; DAGAF: 1.4 ± 0.1] (Figura 23C). Con respecto al RG no se observaron cambios [$t=0.2$, $p=0.7$; DC: 1 ± 0.2 ; DAGAF: 0.96 ± 0.12].

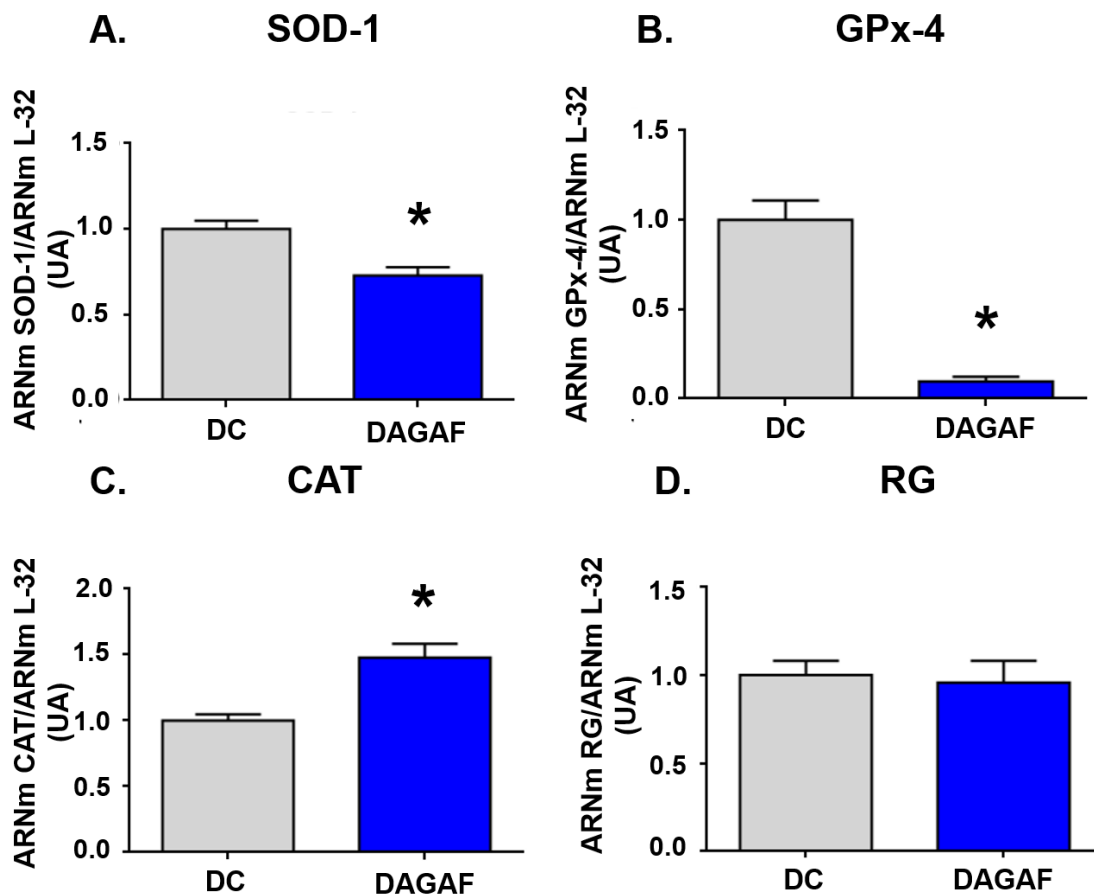


Figura 22. Expresión génica de hipocampo normalizada a la expresión de L32 utilizando el método $\Delta\Delta Ct$, de los grupos DC y DAGAF (edad: 174d-179d). A) SOD-1. B) GPx-4. C) CAT. D) RG. Datos expresados como media \pm EE; DC n=8, DAGAF n=8; $p < 0.05^*$ vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa.

9.9 Correlaciones

En la Figura 23, se muestran la matriz de correlaciones para el grupo DC como para el DAGAF y en la Tabla 7 se presentan el valor p y coeficiente de correlación para las correlaciones más importantes.

Para la DAGAF se encontraron correlaciones directamente proporcionales (positivas) la actividad de enzimas antioxidantes del hipocampo con IDs e IRs (GPx vs ID 2h; GPx vs ID 7d; GPX vs IR 24h; SOD vs IR7d); la concentración de ERO con la cantidad de grasa, peso y expresión génica de la catalasa en CPF (ERO H vs grasa total; ERO H vs peso; ERO CPF vs peso; ERO CPF vs expresión génica de CAT); la expresión génica de RG con la de enzimas antioxidantes en hipocampo (expresión génica de RG vs expresión génica de GPx-4; expresión génica de RG vs expresión génica de CAT); la expresión génica de SOD en hipocampo con la grasa total y el tejido graso por RM; la actividad de SOD en hipocampo con la de CAT en CPF; la concentración de MDA en hipocampo y la de corticosterona sérica; y el I.A. con el peso.

Por otro lado, presentaron correlaciones inversamente proporcionales entre: el IR a los 7 días con el IA; la concentración sérica de MDA con la actividad de SOD en hipocampo; la expresión génica de GPx-4 en CPF con ID 2h e IR 2h.

En el grupo DC se encontraron correlaciones positivas entre la actividad de CAT en hipocampo con ID 2h e IR 2h.

Mientras que las correlaciones negativas del grupo DC fueron: la actividad de la CAT en CPF con el ID7d e IR 7d; la expresión génica de enzimas antioxidantes con la corticosterona (SOD-1 en hipocampo vs corticosterona; GPx-4 en hipocampo vs corticosterona; CAT vs corticosterona); la expresión génica de SOD con la de GPX en CPF; la expresión génica de CAT en hipocampo con la concentración de MDA en CPF; la expresión génica de CAT en CPF con la grasa total; la expresión génica de RG en hipocampo con el tejido graso por RM; la expresión génica de RG en CPF con grasa total; el MDA en CPF con el peso; y la grasa total el tejido graso por RM.

Tabla 7. Correlaciones significativas de diversos parámetros evaluados.

GRUPO	PARÁMETRO vs PARÁMETRO		<i>r</i>	<i>p</i>
DAGAF	GPx Hipocampo	ID 24h	0.93	<0.001
	GPx Hipocampo	ID 7d	0.93	<0.001
	GPx Hipocampo	IR 24h	0.93	<0.001
	SOD Hipocampo	IR 7d	0.89	<0.001
	CAT CPF	IR 7d	0.96	<0.001
	GPx CPF EG	ID 2h	-0.75	0.02
	GPx CPF EG	IR 2h	-0.75	0.02
	SOD Hipocampo	MDA Suero	-0.8	0.02
	RG H EG	GPx H EG	0.81	0.01
	RG H EG	CAT H EG	0.81	0.01
	SOD H EG	Grasa total	0.73	0.03
	SOD H EG	TG RM	0.79	0.01
	ERO Hipocampo	Grasa total	0.86	<0.001
	ERO Hipocampo	Peso	0.96	<0.001
	ERO CPF	CAT CPF EG	0.9	0.004
	ERO CPF	Peso	0.76	0.04
	MDA Hipocampo	Corticosterona	0.91	0.004
	I.A.	Peso	0.82	0.003
	ERO Hipocampo	IR 7d	-0.68	0.02
	DC	CAT H	ID 2h	0.75
CAT H		IR 2h	0.75	0.03
CAT CPF		ID 7d	-0.75	0.03
CAT CPF		IR 7d	-0.75	0.03
SOD CPF EG		GPx CPF EG	-0.75	0.04
Corticosterona		SOD H EG	-0.7	0.04
Corticosterona		GPx H EG	0.72	0.04
Corticosterona		CAT CPF EG	-0.73	0.03
Grasa total		CAT CPF EG	-0.75	0.03
RG H EG		TG RM	0.74	0.03
RG CPF EG		Grasa total	-0.74	0.03
MDA CPF		Peso	-0.85	0.02
TG RM		Grasa total	-0.73	0.01

r: coeficiente de correlación. p: valor p. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. ID 2h: Índice de discriminación 2h. IR 24h Índice de reconocimiento 24h. ID.7d: Índice de discriminación 7 días. IR 2h: Índice de reconocimiento 2h. ID 24h Índice de discriminación 24h. IR 7d: Índice de discriminación 7 días. MDA CPF: Malondialdehído en corteza prefrontal. ERO CPF: Especies reactivas de oxígeno en corteza prefrontal. CAT CPF: Actividad de CAT en corteza prefrontal. I.A.: Índice de adiposidad TG RM: Tejido graso por resonancia magnética. SOD H EG: expresión génica de SOD-1 hipocampo. GPx.H.EG: expresión génica de GPx-4 hipocampo. CAT.H.EG: expresión génica de CAT hipocampo. RG.H.EG: expresión génica de RG hipocampo. SOD.CPF.EG: expresión génica de SOD-1 corteza prefrontal. GPx.CPF.EG: expresión génica de GPx-4 corteza prefrontal. CAT CPF EG: expresión génica de CAT corteza prefrontal. RG CPF EG: expresión génica de RG corteza prefrontal.

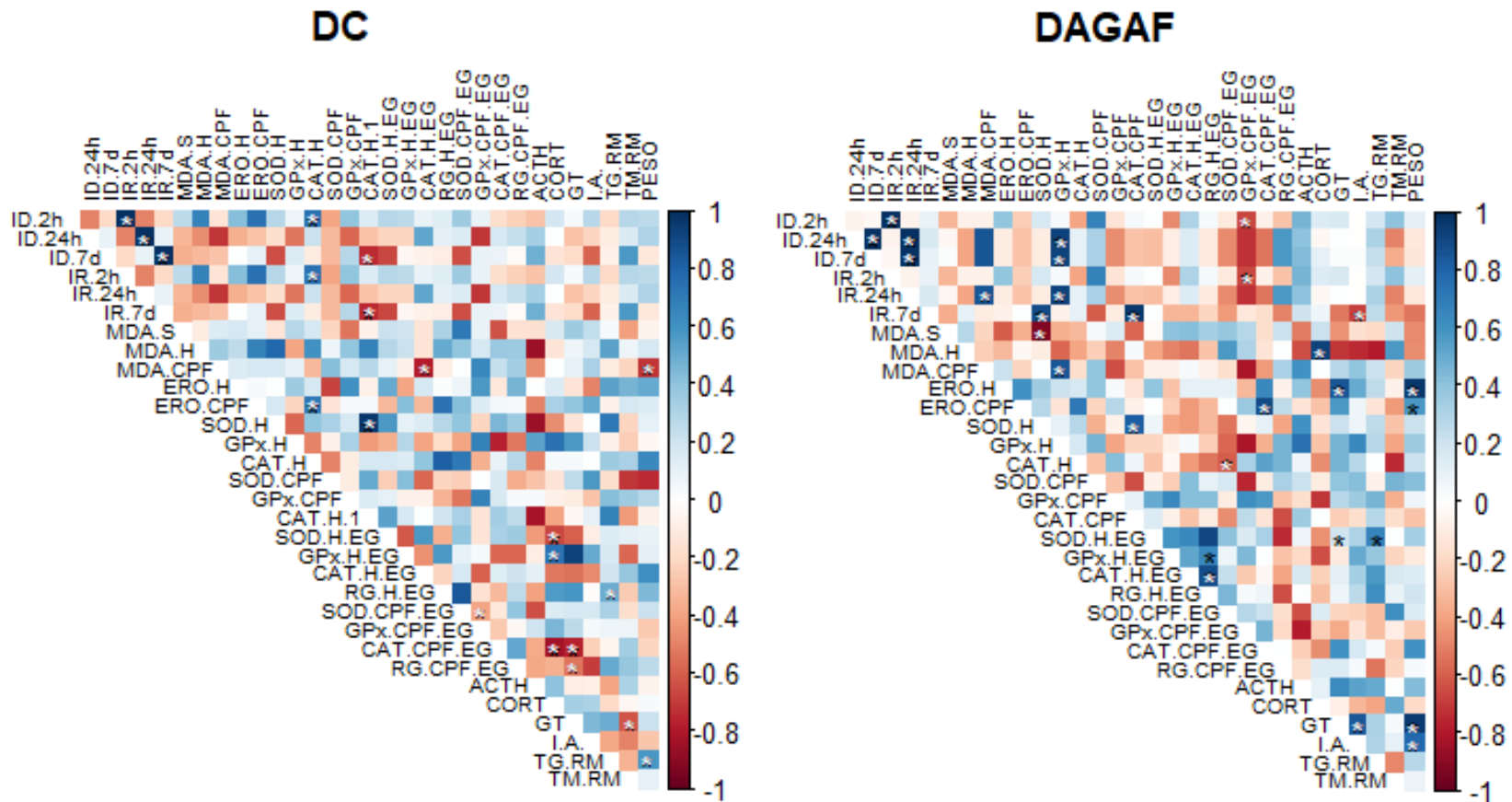


Figura 23. Matriz de correlación de los diversos parámetros evaluados para los grupos DC y DAGAF. Se puede observar correlaciones negativas con color rojo y correlaciones positivas con color azul; DC n=10, DAGAF n=10; p < 0.05* vs DC. DC: Dieta control. DAGAF: Dieta alta en grasa alta en fructosa. ID.2h: Índice de discriminación 2h. IR.24h Índice de reconocimiento 24h. ID.7d: Índice de discriminación 7 días. IR.2h: Índice de reconocimiento 2h. ID.24h Índice de discriminación 24h. IR.7d: Índice de discriminación 7 días. MDA.S: Malondialdehído en suero. MDA.H: Malondialdehído en hipocampo. ERO.H: Especies reactivas de oxígeno en hipocampo. SOD.H: Actividad de SOD en hipocampo. GPx.H: Actividad de GPx en hipocampo. CAT.H: Actividad de CAT en hipocampo MDA.CPF: Malondialdehído en corteza prefrontal. ERO.CPF: Especies reactivas de oxígeno en corteza prefrontal. SOD.CPF: Actividad de SOD en corteza prefrontal. GPx.CPF: Actividad de GPx en corteza prefrontal. CAT.CPF: Actividad de catalasa en corteza prefrontal. SOD.H.EG: expresión génica de SOD-1 hipocampo. GPx.H.EG: expresión génica de GPx-4 hipocampo. CAT.H.EG: expresión génica de CAT hipocampo. RG.H.EG: expresión génica de RG hipocampo. SOD.CPF.EG: expresión génica de SOD-1 corteza prefrontal. GPx.CPF.EG: expresión génica de GPx-4 corteza prefrontal. CAT.CPF.EG: expresión génica de CAT corteza prefrontal. RG.CPF.EG: expresión génica de RG corteza prefrontal. ACTH: Hormona adenocorticotropa. CORT: Corticosterona. GT: Tejido graso total. I.A.: Índice de adiposidad TG.RM: Tejido graso por resonancia magnética.TM.RM: Tejido graso por resonancia magnética.

10. Discusión

Mediante el presente estudio, se investigó el papel del EO asociado a la obesidad y los déficits cognitivos en un modelo de DAGAF en roedores. En la obesidad inducida por DAGAF desde etapas tempranas del desarrollo, se produjo déficits en la MR evaluadas mediante la prueba RON/RNL, esto demostrado por disminución en los índices los índices de discriminación ID y el IR. Dichos déficits se relacionaron con un desequilibrio en el estado redox, así como el cambio en la expresión genética de las enzimas antioxidantes y el RG en hipocampo y la CPF.

La prevalencia de la obesidad está aumentando a un ritmo sin precedentes en todo el mundo (Finucane *et al.*, 2011). Así mismo, se sabe que la obesidad es un importante factor de riesgo de enfermedades crónicas como: resistencia a la insulina, hipertensión arterial sistémica, diabetes *mellitus* tipo 2, algunos tipos de cánceres, desordenes musculoesqueléticos, patologías cardiovasculares, (Choi *et al.*, 2020; de Mello *et al.*, 2019) y múltiples trastornos neuropsiquiátricos (Castanon *et al.*, 2014). Por su parte, la etiología de la obesidad es multifactorial (WHO, 2021; Zanini *et al.*, 2017), siendo uno de los factores principales para su desarrollo el consumo de dietas altas en grasa y fructosa (DAGAF) (Conlon *et al.*, 2013; Gomez-Pinilla *et al.*, 2021; Shamah *et al.*, 2020), que tienen la capacidad de desregular el control central entre el consumo y el gasto energético la cual está ligada a la presencia de alteraciones metabólicas (De Souza *et al.*, 2005; Nabil *et al.*, 2020). En el modelo utilizado en el presente trabajo, observamos que el consumo de la DAGAF desde etapas tempranas del desarrollo generó obesidad en las ratas experimentales demostrado por el aumento de peso, en conjunto con el incremento en el porcentaje de tejido graso.

En el presente estudio la cantidad de alimento y kcal ingeridos por las ratas experimentales fueron menores que en las ratas con dieta control (DC), es decir, que la cantidad de energía consumida por las ratas obesas fue menor a los controles, pero ganaron mayor peso. Es sabido que dietas altas en grasa generan un desequilibrio de la homeostasis energética y el desarrollo de sobrealimentación (Ji *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2016; Woods *et al.*, 2003), en el caso de la DAGAF existen diversos reportes en donde no se desarrolla sobrealimentación, sino que se

presenta una ingesta inferior y la cantidad de Kcal se iguala o supera al control (Crescenzo *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2021; Martinez *et al.*, 2021; Mulati *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021; Sulistyowati *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020). De tal forma que, nuestros hallazgos van acorde con otros estudios previos (Fouret *et al.*, 2018; Mulati *et al.*, 2020) donde se observó un aumento en la eficiencia energética (Crescenzo *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2021; Mulati *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020) en los animales expuestos a este tipo de dietas. La mayor ganancia de peso observada en las ratas DAGAF pudiera deberse a que los componentes de la dieta son factores esenciales para la ganancia de peso, ya que dietas isocalóricas con alto contenido de grasas y carbohidratos pueden generar incremento del almacenamiento en forma de grasa (Hall & Guo, 2016). Aunado a esto, la obesidad que presentaron las ratas experimentales pudiera estar asociada a sarcopenia (Kob *et al.*, 2015; Livshits & Kalinkovich, 2019), patología caracterizada por pérdida de masa y función del músculo esquelético en conjunto con un aumento en el tejido adiposo presente frecuentemente en el envejecimiento pero no limitada a este (Cruz-Jentoft *et al.*, 2019; Donini *et al.*, 2022), esto sugerido por la disminución en la masa magra determinado por resonancia magnética. Sin embargo, debido a que la masa magra incluye vísceras, hueso y músculo esquelético (Nuijten *et al.*, 2022), y el hecho de que no evalúa el funcionamiento del tejido muscular, nuestros datos únicamente podrían hipotetizar la presencia de sarcopenia, más no confirmarla.

El aumento en el tejido graso que caracteriza a la obesidad está vinculado al desarrollo de enfermedades crónicas (Foster *et al.*, 2017; González *et al.*, 2017; Naguib *et al.*, 2021). Igualmente, estudios en humanos señalan la relación entre el incremento del IMC con el deterioro de funciones cognitivas (Dye *et al.*, 2017; Wahid *et al.*, 2021), entre ellas la memoria episódica.

Tras un consumo crónico de DAGAF, pudimos observar un déficit en la memoria de reconocimiento (MR) por parte de las ratas obesas mediante la evaluación de RON/RNL, evidenciado por el decremento en los índices de discriminación y reconocimiento, sugiriendo que la DAGAF deteriora el procesamiento de la memoria en las ratas macho. Diversos estudios en modelos murinos en los que se ha estudiado las consecuencias deletéreas de la DAGAF en

procesos de memoria y aprendizaje (*Gladding et al., 2018*), son coherentes con nuestros resultados, al reportar deficiencias en el aprendizaje y memoria espacial al observarse aumento de la latencia (*Chávez-Gutiérrez et al., 2022; Espinosa-García et al., 2020; Kalivarathan et al., 2020; Liu et al., 2017; Mamo et al., 2019; Mi et al., 2017; Mulati et al., 2020; Mulati et al., 2021; Wang et al., 2019*); disminución del tiempo invertido en el cuadrante objetivo (*Espinosa-García et al., 2020; Kalivarathan et al., 2020; Lin et al., 2017; Mi et al., 2017; Mulati et al., 2021; Wang et al., 2019*) y del número de cruces a la plataforma (*Espinosa-García et al., 2020; Mi et al., 2017*) en el paradigma del laberinto acuático de Morris posterior a un periodo de 12 a 24 semanas de dieta; así como menor alternancia espontánea en el laberinto en Y durante 8 a 14 semanas con dieta (*Anderson et al., 2013; Mulati et al., 2020; Yu et al., 2019*); e incremento en los errores en la memoria de referencia radial en el laberinto radial tras 60 días de dieta (*Kalivarathan et al., 2020*). De igual manera, en pruebas que aprovechan la capacidad innata de los roedores por lo novedoso como lo son las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso (RON) y reconocimiento de nueva localización de objeto (RNL) (*Ennaceur, 2010*), se ha informado deterioro en dichas pruebas al demostrarse un descenso en el ID (*Martínez-Orozco et al., 2021; Martínez-Orozco, 2020*), el IR (*Chávez-Gutiérrez et al., 2022*) y el índice de preferencia (*Mulati et al., 2020; Mulati et al., 2021*) después de inducir obesidad durante 10 a 14 semanas, dichos paradigmas se evaluaron con tiempos de retardo de 3, 5, 10 min y 24h. Como algo novedoso de este paradigma, en el presente estudio se evaluó la MR con una variable más en el tiempo de retardo de 7 días.

Un punto importante a destacar con el uso de este tipo de paradigma conductual son los niveles de ansiedad, los cuales pueden interferir con las pruebas de memoria (*Mello et al., 2008*), debido a ello es posible que el deterioro en la MR pudiera ser asociado con este tipo de comportamiento. Por tal motivo, el paradigma utilizado para la evaluación de la MR incluyó 3 días de habituación en el aparato de campo abierto previo a la colocación de los objetos para su reconocimiento, con el propósito de que el entorno novedoso no genere comportamiento parecido a la ansiedad e interfiera con el RON/RNL (*Sampaio et al., 2020*), en dicho periodo de habituación no existieron diferencias en la distancia recorrida entre ambos grupos,

infiriendo de esta manera que el entorno novedoso no generó comportamiento parecido a la ansiedad que interfiriera con la prueba. Por otro lado, el tiempo total de exploración a hacia los objetos, no habla del tiempo necesario para familiarizarse a los objetos presentados (Ennaceur, 2010), por lo que su incremento en el grupo DAGAF con respecto al control nos podría hablar de un mayor tiempo para la habituación de estos.

Existen diversos procesos que se ven alterados por la obesidad inducida por dieta; múltiples estudios analizan los posibles mecanismos por los cuales se desarrolla el daño mnémico (Letra *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Shapiro *et al.*, 2008; Takechi *et al.*, 2017), pero ciertamente no son del todo claros (Spencer *et al.*, 2017), en este trabajo se propuso al estrés oxidante (EO) como posible mecanismo por el cual la DAGAF ejerce una acción negativa sobre el deterioro de los procesos de memoria y aprendizaje, ya que existe evidencia entre la obesidad y el desequilibrio del estado *redox* (Bayliak *et al.*, 2019).

La hormona adenocorticotrópica (ACTH) y corticosterona en suero se vieron incrementados en el grupo DAGAF, reflejando un efecto negativo de la obesidad sobre la secreción de estas hormonas; la obesidad está asociada con hiperactividad en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) en conjunto con un aumento de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1), que convierte el cortisol inactivo a su forma activa aumentando su concentración local en órganos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo, lo que explica parcialmente las comorbilidades metabólicas y cardiovasculares asociadas a la obesidad por la desregulación del eje HHA (Abraham *et al.*, 2013; Vaidya, 2016). A su vez, el aumento de las hormonas esteroides, genera incremento del EO por aumento en el metabolismo y regulación de las defensas antioxidantes endógenos, especialmente por decremento o incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes (Casagrande *et al.*, 2020), puesto que los glucocorticoides promueven la fosforilación oxidativa, aumentando la actividad de la cadena respiratoria y las concentraciones de ARN de todos los complejos que componen la cadena, a través de seis regiones en el ADN mitocondrial que son similares a los elementos de respuesta a glucocorticoides, en donde los glucocorticoides ejercen sus efectos

(Feng & Tang, 2014), propiciando de esta manera un desbalance *redox* en el organismo por disfunción en la cadena de electrones y aumento en la producción de ERO (Manoli *et al.*, 2007).

En conjunto con los hallazgos anteriores, el consumo de dietas hipercalóricas favorece la aparición de EO sistémico, por aumento en la oxidación de sustratos en las mitocondrias incrementando el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones favoreciendo una fuga de los mismos, llevando a la producción aumentada de ERO (Leloup *et al.*, 2011). Aditivo a esto, los alimentos con un índice glucémico alto generan una mayor hiperglucemia posprandial que a su vez aumenta los productos finales de la glicación avanzada (PFGA) (Guilbaud *et al.*, 2016). Generando todos estos factores un aumento en los radicales libres capaces de dañar las membranas lipídicas e incrementando las concentraciones de las sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS) a nivel sistémico, concordando este estado de oxidación sistémica con nuestros resultados de concentraciones de TBARS séricas elevadas obtenidos en este estudio. Este aumento en el TBARS sérico no correlacionó con los índices de discriminación y de reconocimiento del paradigma RON/RNL tal como informaron anteriormente Chávez-Gutiérrez y colaboradores (2020), pero si encontraron correlación de este marcador de daño oxidante con la prueba del laberinto acuático de Morris.

El aumento de glucocorticoides se ha relacionado con deficiencias en la memoria ocasionados por estrés metabólico, las cuales se han revertido por inhibidores de la 11 β HSD1 en el hipocampo (Puigoriol-Illamola *et al.*, 2018). Debido a esto y al hipermetabolismo ocasionado por los glucocorticoides mediado por los receptores de glucocorticoides (GR) (Manoli *et al.*, 2007), se determinó la expresión génica de dichos receptores en el hipocampo y la CPF, observando un incremento relativo de GR con respecto a la expresión de L-32 (gen constitutivo) en hipocampo comparado con las ratas control. Un incremento en la concentración del RG en la mitocondria sumado al estrés metabólico generado por los componentes de la dieta y una exposición crónica a glucocorticoides puede generar un aumento en ERO, disfunción mitocondrial y anomalías estructurales en las mitocondrias (Manoli *et al.*, 2007). Por otro lado, en la CPF no existió diferencia en la expresión génica

de GR, sin embargo, sería necesario evaluar la expresión proteica del receptor, sus sitios de fosforilación, así como la afinidad ligando-receptor para relacionar de una mejor manera los hallazgos obtenidos.

La marca fluorescente de 2',7'- diclorofluoresceína en hipocampo y CPF se vio elevada en las ratas con DAGAF, representando esto un aumento en la ERO (H_2O_2 , $OH\cdot$ y oxígeno singlete) en ambas regiones cerebrales, esto perpetuado por los factores antes mencionados que favorecen un estado pro-oxidante. Por sí mismo el EO puede generar déficit mnémicos, dificultando el reconocimiento de los nuevos estímulos y por ende disminuir los índices de diferenciación y de reconocimiento presentes en nuestras ratas obesas, al contribuir en el inicio y mantenimiento sostenido de la respuesta inmune por diversas vías, generar daño a macromoléculas (Kalivarathan *et al.*, 2017), muerte celular y apoptosis (Annunziato *et al.*, 2003), siendo la mitocondria uno de sus blancos más perjudicados por el EO, debido a la existencia de múltiples enzimas redox requeridas para la transferencias de electrones necesarios para la suministración de ATP del cual el sistema nervioso central es altamente dependiente, las cuales incrementan su actividad debido a una regulación positiva del ciclo del ácido tricarboxílico debido a este tipo de dieta, especialmente un aumento en el complejo I (Bayliak *et al.*, 2022).

Este aumento de EO a nivel cerebral se sabe que contribuye a la patogenia de enfermedades neurodegenerativas y que el aumento en la producción de radicales libres participa en la patogenia y progresión del deterioro cognitivo al interrumpir la transmisión sináptica, la función mitocondrial, el transporte axonal, aumentar la neuroinflamación y dañar estructuralmente los componentes celulares, contribuyendo de esta forma a la pérdida neuronal (Tan, 2019).

De forma integral, obtuvimos una correlación directamente proporcional entre la concentración de ERO en hipocampo con el peso y la grasa total de animales que recibieron DAGAF, y en el caso de la CPF sólo correlacionó con el peso, siendo concordante con estudios que relacionan las ERO con el IMC (Tunc *et al.*, 2011) y donde se ha involucrado la acumulación grasa con diversos marcadores de EO en seres humanos (Keaney *et al.*, 2003), sugiriendo que la disfunción del tejido adiposo incrementa la generación de ERO (Matsuda & Shimomura, 2013).

Las ERO son moléculas de señalización que cumplen papeles fisiológicos en el funcionamiento celular (McCord, 1995), se generan a partir del metabolismo oxidante, y su sobreproducción puede generar daño a las biomoléculas, llevando eventualmente a apoptosis, daño y muerte celular. (Annunziato *et al.*, 2003). Teniendo esto en cuenta, todos los órganos son susceptibles de sufrir daño oxidante, sin embargo, el cerebro tiene mayor vulnerabilidad a sus efectos debido a sus altas demandas energéticas, altas concentración de ácidos grasos insaturables y su reducida capacidad antioxidante (Cobley *et al.*, 2018; Dal-Pizzol *et al.*, 2000). Por tal razón, fue menester la evaluación del daño por EO en las membranas lipídicas en hipocampo y CPF regiones cerebrales relacionadas con la MR. Previamente Crescenzo *et al.* (2019) y Kalivarathan *et al.* (2017) usando una dieta similar a la nuestra, observaron un incremento en la concentración de TBRS, este efecto lo observamos también tras 20 semanas de exposición a la dieta en ambas regiones evaluadas.

El significado biológico del incremento de un marcador de daño oxidante como el MDA, causada por la obesidad generada por dietas hipercalóricas es que dicho incremento va en función de la cantidad de ERO generadas y la capacidad del sistema antioxidante de contrarrestarlas. Tanto en el hipocampo como en la CPF se constató un aumento en la concentración de ERO similar a lo reportado por Mi y colaboradores (2017) en las mitocondrias del hipocampo. Estos aumentos pudieran reflejar una sobrecarga metabólica debido a los componentes de la dieta al aumentar la oxidación de ácidos grasos y carbohidratos por parte de las mitocondrias, agotando los aceptadores intermedios de electrones (NADH y FADH₂) (Kalivarathan *et al.*, 2017; Matsuda & Shimomura, 2013) y propiciando un microambiente pro-oxidante.

La actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) se elevó en ambas regiones cerebrales, y sólo para CPF se incrementó la catalasa (CAT) en las ratas que recibieron DAGAF. Dicho aumento contrasta con hallazgos previos en los que se ha observado una disminución de las enzimas antioxidantes en conjunto con un aumento en biomarcadores de daño oxidante ocasionados por este tipo de dieta (Batandier *et al.*, 2020; Kalivarathan *et*

al., 2017; Labban *et al.*, 2020). Este aumento en la actividad enzimática que nosotros reportamos, puede responder a un aumento adaptativo por el incremento de ERO (Salminen & Paul, 2014), al tener que contrarrestarlas por un desafío metabólico desde etapas tempranas del desarrollo, pasando posteriormente a evaluar la expresión génica de dichas enzimas, por el hecho de que bajo condiciones de EO se inducen mecanismos de defensa en las células, que incluyen enzimas antioxidantes con el propósito de reducir las ERO (Michiels *et al.*, 1994) evitando de esta manera la consecuente formación de hidroperóxidos lipídicos y no lipídicos. La principal vía que regula el sistema de defensa antioxidante es Keap1-Nrf2, en la cual Nrf2 se separa de Keap1 en presencia de EO reconociendo una secuencia potenciadora en el ADN (Elementos de respuesta antioxidante), dando como resultado la regulación ascendente de la expresión de múltiples genes que constituyen un sistema de defensa antioxidante (Hannan *et al.*, 2020), entre los que se encuentran las enzimas CAT, GPx y SOD.

En cuanto a la expresión génica de las enzimas antioxidantes, existieron discrepancias en lo encontrado para la actividad de estas. En el hipocampo la expresión de SOD-1 correspondió con el incremento visto en su actividad enzimática. En cuanto la expresión de GPx-4, no existió diferencias con la DC mientras que la actividad total de la enzima si aumento, dicha enzima cuenta con diversas isoformas (Adachi & Wang, 1998; Calabrese & Canada, 1989), que podrían estarse sobre expresando de forma preferente para limitar el daño por EO. GPx-4 fue evaluada por ser expresada en el cerebro teniendo funciones antioxidantes y antiapoptóticas (Savaskan *et al.*, 2007), sin embargo, la GPx-1 tiene importancia en el cerebro para limitar la LPO (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Por otro lado, la expresión de la CAT aumento en el grupo DAGAF, sin embargo en su actividad no existieron diferencias con la DC, pudiendo suponer una inhibición de su actividad por óxido nítrico (Bauer, 2015) o alteraciones postraduccionales que limitan su sobreexpresión a nivel proteico. La expresión de SOD-1 y GPX-4 en CPF fue menor que el control y su actividad fue mayor, pudiendo significar que otras isoformas de estas enzimas pudieran estar compensando su expresión. Además, por las

funciones antiapoptóticas de las GPx-4, su disminución podría estar relacionada con un aumento de la apoptosis en esta región.

Algunos de los incrementos en la actividad enzimática se correlacionaron directamente con IDs e IRs del RON/RNL, pudiendo aludir a un papel protector de la actividad de la GPx con un tiempo de retardo de 24 h y 7 días, y de la SOD en hipocampo y la CAT en CPF sólo a los 7 días, en el procesamiento de la MR.

11. Resumen de resultados

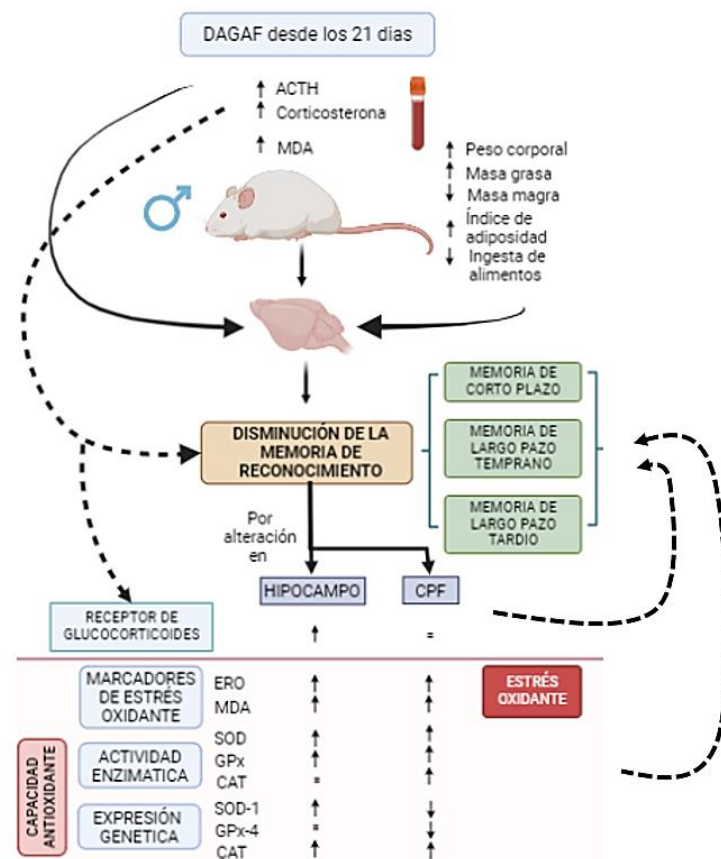


Figura 24. Esquema que resume los resultados obtenidos tras 20 semanas de inducción de obesidad por DAGAF en ratas macho Wistar de 21 días. En donde se muestra que las ratas presentaron aumento de peso, con aumento en la masa grasa, el índice de adiposidad y disminución de la masa magra, acompañado de una disminución en la ingesta de alimentos. Además, estos factores condicionaron un incremento sérico en las hormonas esteroides (corticosterona y adenocotrópica) y el MDA. Todos estos factores contribuyeron a la disminución de la memoria de reconocimiento en todos los tiempos evaluados, afectando al hipocampo y la CPF con aumento en el EO, las enzimas antioxidantes SDO y GPx, y diversos cambios en la expresión de distintas isoformas de estas enzimas.

- La DAGAF generó un aumento del malondialdehído, propio de un ambiente sistémico pro-oxidante. En conjunto con el incremento sistémico en la corticosterona, ACTH y la expresión génica del receptor de glucocorticoides en hipocampo, correlacionando el incremento de corticosterona con la concentración de malondialdehído en hipocampo.
- Existió un aumento de peso en las ratas con DAGAF a expensa del aumento tejido adiposo e índice de adiposidad, y disminución del tejido magro, coexistiendo estos hallazgos con una menor ingesta de alimentos.
- Se generó deterioro de la memoria de reconocimiento en las ratas macho con DAGAF, corroborado por disminución en los índices de discriminación y reconocimiento, los cuales correlacionaron negativamente con el índice de adiposidad.
- La exposición de la DAGAF aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno y malondialdehído en hipocampo y CPF, relacionándose directamente las ERO en estas estructuras con el peso y con la grasa total, en el caso del hipocampo.
- La actividad de enzimas antioxidantes aumentó, obedeciendo probablemente a cambios compensatorios por aumento del estrés oxidante. El aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa en hipocampo correlacionó de forma positiva con los índices de discriminación y reconocimiento lo que sugiere un papel protector en el desarrollo de los déficits en la memoria de reconocimiento.

12. Conclusiones

El consumo de una dieta alta en grasa y fructosa de forma crónica desde el destete de las crías macho genera un fenotipo obeso, desencadena un deterioro en la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo, debido a un incremento en los marcadores de estrés oxidante y la capacidad antioxidante en las regiones cerebrales del hipocampo y la corteza prefrontal, así como a la excesiva liberación de ACTH y corticosterona ocasionada por una desregulación en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Dichos cambios se proponen como mecanismos potenciales para explicar los déficits de memoria observados en el presente trabajo de investigación.

13. Perspectivas futuras

- Evaluar los efectos de la DAGAF sobre otros mecanismos descritos de daño cognitivos ocasionados por dieta (resistencia a la insulina, la integridad de la barrera hematoencefálica, parámetros inflamatorios, la resistencia a la leptina).
- Evaluar la expresión proteica para las enzimas antioxidantes y el RG.
- Determinar la expresión genética de otras isoformas de las enzimas antioxidantes (SOD-2, GPX-1).
- Evaluar la expresión genética de proteínas proapoptóticas por vía mitocondrial (Bcl-2, BAX, caspas 3 y 9), en ambas regiones cerebrales.
- Evaluar la expresión génica para otras isoformas de enzimas antioxidantes en hipocampo y CPF.
- Determinar el efecto de la DAGAF sobre la capacidad de inducir sarcopenia.
- Evaluar el dimorfismo sexual de los efectos cognitivos y metabólicos ocasionados por la DAGAF.

13. Referencias

- Abraham, S. B., Rubino, D., Sinaii, N., Ramsey, S., & Nieman, L. K. (2013). Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: A cross-sectional study of obese subjects and review of the literature. *Obesity*, 21(1), E105–E117. <https://doi.org/10.1002/oby.20083>
- Adachi, T., & Wang, X. L. (1998). Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Letters*, 433(1–2), 166–168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00903-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00903-X)
- Adzic, M., Djordjevic, A., Demonacos, C., Krstic-Demonacos, M., & Radojicic, M. B. (2009). The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(11), 2181–2188. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.001>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aggleton, J. P. (1998). RECOGNITION MEMORY IN RATS---I . CONCEPTS AND CLASSIFICATION. *Progress in Neurobiology*, 54(97). [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00060-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00060-9)
- Ailhaud, G., & Guesnet, P. (2004). Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: A short review and an opinion. *Obesity Reviews*, 5(1), 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2004.00121.x>
- Akalestou, E., Genser, L., & Rutter, G. A. (2020). Glucocorticoid Metabolism in Obesity and Following Weight Loss. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00059>
- Alesci, S., Manoli, I., Michopoulos, V. J., Brouwers, F. M., Le, H., Gold, P. W., Blackman, M. R., Rennert, O. M., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2006). Development of a human mitochondria-focused cDNA microarray (hMitChip) and validation in skeletal muscle cells: Implications for pharmaco- and mitogenomics. *Pharmacogenomics Journal*, 6(5), 333–342. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500377>
- Allende, G., Chavira, R., & Quintanar-Stephano, A. (2004). The role of corticosterone in the metabolic recovery after intrasplenic adrenal autotransplantation in rats. *Endocrine Journal*, 51(3), 325–332. <https://doi.org/10.1507/endocrj.51.325>
- Amri, Z., Ghorbel, A., Turki, M., Akrouf, F. M., Ayadi, F., Elfeki, A., & Hammami, M. (2017). Effect of pomegranate extracts on brain antioxidant markers and cholinesterase activity in high fat-high fructose diet induced obesity in rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1842-9>
- Anderson, R. A., Qin, B., Canini, F., Poulet, L., & Roussel, A. M. (2013). Cinnamon

- counteracts the negative effects of a high fat/high fructose diet on behavior, brain insulin signaling and Alzheimer-associated changes. *PLOS ONE*, 8(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083243>
- Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., & Di Renzo, G. F. (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: Role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicology Letters*, 139(2–3), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00427-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00427-7)
- Asaba, K., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Asai, M., Oiso, Y., Pathophysiology, C., & Y, I. M. M. (2004). Attenuation by Reactive Oxygen Species of Glucocorticoid Suppression on Proopiomelanocortin Gene Expression in Pituitary Corticotroph Cells. *Endocrinology*, 145(1), 39–42. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0375>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Baker, K. D., Loughman, A., Spencer, S. J., & Reichelt, A. C. (2017). The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 83(June), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.014>
- Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M., & Viezzoli, M. S. (1998). Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*, 37(34), 11780–11791. <https://doi.org/10.1021/bi9803473>
- Barquera, S., & Rivera, J. A. (2020). Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 8(9), 746–747. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30269-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30269-2)
- Barrera, G., Gentile, F., Pizzimenti, S., Canuto, R. A., Daga, M., Arcaro, A., Cetrangolo, G. P., Lepore, A., Ferretti, C., Dianzani, C., & Muzio, G. (2016). Mitochondrial dysfunction in cancer and neurodegenerative diseases: Spotlight on fatty acid oxidation and lipoperoxidation products. *Antioxidants*, 5(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox5010007>
- Bartolacci, C., Andreani, C., El-Gammal, Y., & Scaglioni, P. P. (2021). Lipid Metabolism Regulates Oxidative Stress and Ferroptosis in RAS-Driven Cancers: A Perspective on Cancer Progression and Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.706650>
- Batandier, C., Poyot, T., Marissal-Avry, N., Couturier, K., Canini, F., Roussel, A. M., & Hininger-Favier, I. (2020). Acute emotional stress and high fat/high fructose diet modulate brain oxidative damage through NrF2 and uric acid in rats. *Nutrition Research*, 79, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.009>

- Bauer, G. (2015). Increasing the endogenous NO level causes catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis signaling specifically in tumor cells. *Redox Biology*, 6, 353–371. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.017>
- Bayliak, M. M., Abrat, O. B., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2019). Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: Comparison between *Drosophila* and mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 228, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.027>
- Bayliak, M. M., Vatashchuk, M. V., Gospodaryov, D. V., Hurza, V. V., Demianchuk, O. I., Ivanochko, M. V., Burdyliuk, N. I., Storey, K. B., Lushchak, O., & Lushchak, V. I. (2022). High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1866(12), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130226>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2015). Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. *Nutrients*, 7(8), 6719–6738. <https://doi.org/10.3390/nu7085307>
- Bentham, J., Di Cesare, M., Bilano, V., Bixby, H., Zhou, B., Stevens, G. A., Riley, L. M., Taddei, C., Hajifathalian, K., Lu, Y., Savin, S., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Chirita-Emandi, A., Hayes, A. J., Katz, J., Kelishadi, R., Kengne, A. P., Khang, Y. H., ... Cisneros, J. Z. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 390(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)
- Berg, R. M. G., Møller, K., & Bailey, D. M. (2011). Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(7), 1532–1544. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.48>
- Bonomini, F., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2015). Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease*, 6(2), 109–120. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0305>
- Bose, M., Oliván, B., & Laferrère, B. (2009). Stress and obesity: The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in metabolic disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 16(5), 340–346. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32832fa137>
- Bracke, A., Domanska, G., Bracke, K., Harzsch, S., van den Brandt, J., Bröker, B., & von Bohlen und Halbach, O. (2019). Obesity Impairs Mobility and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1177/1179069519883580>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(5), 248–254. <https://doi.org/10.1016/0003->

- Brasilino, I., Bento, M., Souza, D., Rodrigues, S., Macedo, P., Cristina, K., Hypolito, R., Helena, R., & Freitas, F. (2019). Episodic-like memory impairment induced by sub-anaesthetic doses of ketamine. *Behavioural Brain Research*, 359, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.031>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brown, M. W., Warburton, E. C., & Aggleton, J. P. (2010). Recognition Memory: Material, Processes, and Substrates. *Hippocampus*, 20, 1228–1244. <https://doi.org/10.1002/hipo.20858>
- Calabrese, E. J., & Canada, A. T. (1989). Catalase: Its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacology and Therapeutics*, 44(2), 297–307. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90069-7](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90069-7)
- Casagrande, S., Stier, A., Monaghan, P., Loveland, J. L., Boner, W., Lupi, S., Trevisi, R., & Hau, M. (2020). Increased glucocorticoid concentrations in early life cause mitochondrial inefficiency and short telomeres. *The Journal of Experimental Biology*, 223, 1–13. <https://doi.org/10.1242/jeb.222513>
- Castanon, N., Lasselin, J., & Capuron, L. (2014). Neuropsychiatric comorbidity in obesity: Role of inflammatory processes. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00074>
- Castro-Rodríguez, D. C., Ibáñez, C. A., Uribe, J., Menjivar, M., Granados-Silvestre, M. de los Á., Gerow, K. G., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2020). Strengths and validity of three methods for assessing rat body fat across the life course. *International Journal of Obesity*, 44(12), 2430–2435. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0619-2>
- Castro-Rodríguez, D. C., Reyes-Castro, L. A., Vega, C. C., Rodríguez-González, G. L., Yáñez-Fernández, J., & Zambrano, E. (2020). Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides SD23 Prevents Metabolic Dysfunction Associated with High-Fat Diet–Induced Obesity in Male Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 505–516. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09556-3>
- Chan, J. S. Y., Yan, J. H., & Gregory Payne, V. (2013). The impact of obesity and exercise on cognitive aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00097>
- Chao, O. Y., Huston, J. P., Li, J., Wang, A., & Silva, M. A. D. S. (2016). The Medial Prefrontal Cortex — Lateral Entorhinal Cortex Circuit Is Essential for Episodic-Like Memory and Associative. *Hippocampus*, 645(26), 633–645. <https://doi.org/10.1002/hipo.22547>
- Chávez-Gutiérrez, E., Fuentes-venado, C. E., Rodr, L., Guerra-araiza, C., Larqu, C., Mart, E., Lomel, J., Loza-mej, M. A., Salazar, J. R., Mar, D., Gallardo, J. M. and,

- & Pinto-almaz, R. (2022). High Fructose and High Fat Diet Impair Different Types of Memory through Oxidative Stress in a Sex- and Hormone-Dependent Manner. *Metabolites*, *12*, 1–18. <https://doi.org/10.3390/metabo12040341>
- Cheke, L. G., Bonnici, H. M., Clayton, N. S., & Simons, J. S. (2017). Obesity and insulin resistance are associated with reduced activity in core memory regions of the brain. *Neuropsychologia*, *96*, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2017.01.013>
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., & Wang, Y. (2010). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, *44*(6), 587–604. <https://doi.org/10.3109/10715761003709802>
- Choi, Y., Bose, S., Shin, N. R., Song, E. J., Nam, Y. Do, & Kim, H. (2020). Lactate-fortified puerariae radix fermented by bifidobacterium breve improved diet-induced metabolic dysregulation via alteration of gut microbial communities. *Nutrients*, *12*(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12020276>
- Cholvin, T., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., Nogueira, D. D. S., Robelin, L., Kelche, C., Vasconcelos, A. P. De, & Cassel, J. (2013). The Ventral Midline Thalamus Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions. *The Journal of Neuroscience*, *33*(20), 8772–8783. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (2018). 13 Reasons Why the Brain Is Susceptible To Oxidative Stress. *Redox Biology*, *15*, 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Conlon, B. A., Beasley, J. M., Aebersold, K., Jhangiani, S. S., & Wylie-Rosett, J. (2013). Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*, *5*(10), 4093–4114. <https://doi.org/10.3390/nu5104093>
- Corsica, J. A., & Hood, M. M. (2011). Eating disorders in an obesogenic environment. *Journal of the American Dietetic Association*, *111*(7), 996–1000. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.04.011>
- Cortés-rojo, C., Calderón-cortés, E., Estrada-villagómez, M., & Manzo-avalos, S. (2010). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr*, *41*(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9200-3>.Elucidation
- Crescenzo, R., Bianco, F., Coppola, P., Mazzoli, A., Cigliano, L., Liverini, G., & Iossa, S. (2015). The effect of high-fat–high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats. *European Journal of Nutrition*, *54*(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0699-7>
- Crescenzo, R., Spagnuolo, M. S., Cancelliere, R., Iannotta, L., Mazzoli, A., Gatto, C., Iossa, S., & Cigliano, L. (2019). Effect of Initial Aging and High-Fat/High-

Fructose Diet on Mitochondrial Bioenergetics and Oxidative Status in Rat Brain. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7651–7663. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1617-z>

Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., Bautmans, I., Baeyens, J. P., Cesari, M., ... Schols, J. (2019). Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, 48(1), 16–31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>

Cruz-sanchez, A., Wilkin, J., & Arruda-carvalho, M. (2021). Neurobiology of Learning and Memory Ontogeny of spontaneous recognition memory in rodents. *Neurobiology of Learning and Memory*, 177(107361), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107361>

Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M. M. R., Schröder, N., Quevedo, J., Benfato, M. S., Moreira, J. C. F., & Walz, R. (2000). Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters*, 291(3), 179–182. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01409-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01409-9)

de Kloet, A. D., & Herman, J. P. (2018). Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 48, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.10.005>

de Mello, A. H., Schraiber, R. de B., Goldim, M. P. de S., Garcez, M. L., Gomes, M. L., de Bem Silveira, G., Zaccaron, R. P., Schuck, P. F., Budni, J., Silveira, P. C. L., Petronilho, F., & Rezin, G. T. (2019). Omega-3 Fatty Acids Attenuate Brain Alterations in High-Fat Diet-Induced Obesity Model. *Molecular Neurobiology*, 56(1), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1097-6>

De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192–4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>

Dees, R. L., & Kesner, R. P. (2013). Neurobiology of Learning and Memory The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.013>

Dere, E., Huston, J. P., & Silva, M. A. D. S. (2007). The pharmacology , neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 673–704. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.005>

Devasagayam, T. P. A., Bloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal*

of *Biochemistry & Biophysics*, 40, 300–308.

- Dionysopoulou, S., Charmandari, E., Bargiota, A., Vlachos, N., Mastorakos, G., & Valsamakis, G. (2021). The role of hypothalamic inflammation in diet-induced obesity and its association with cognitive and mood disorders. *Nutrients*, 13(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu13020498>
- Donini, L. M., Busetto, L., Bischoff, S. C., Cederholm, T., Ballesteros-Pomar, M. D., Batsis, J. A., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cruz-Jentoft, A. J., Dicker, D., Frara, S., Frühbeck, G., Genton, L., Gepner, Y., Giustina, A., Gonzalez, M. C., Han, H. S., Heymsfield, S. B., Higashiguchi, T., ... Barazzoni, R. (2022). Definition and Diagnostic Criteria for Sarcopenic Obesity: ESPEN and EASO Consensus Statement. *Obesity Facts*, 15, 321–335. <https://doi.org/10.1159/000521241>
- dos Santos, C. S., Picoito, J., Nunes, C., & Loureiro, I. (2020). Early Individual and Family Predictors of Weight Trajectories From Early Childhood to Adolescence: Results From the Millennium Cohort Study. *Frontiers in Pediatrics*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00417>
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-vieira, R., McEwen, B. S., & Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *PNAS*, 106(9), 3543–3548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812671106>
- Dunah, A. W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y. M., Standaert, D. G., Hersch, S. M., Mouradian, M. M., Young, A. B., Tanese, N., & Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*, 296(5576), 2238–2243. <https://doi.org/10.1126/science.1072613>
- Dye, L., Boyle, N. B., Champ, C., & Lawton, C. (2017). The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(4), 443–454. <https://doi.org/10.1017/S0029665117002014>
- Eacott, M. J., & Easton, A. (2010). Neuropsychologia Episodic memory in animals: Remembering which occasion. *Neuropsychologia*, 48(8), 2273–2280. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.11.002>
- Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Publishing Group*, 18(9), 547–558. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>
- El-Ansary, A. (2012). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as key players in neurological disorders of childhood. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 2(4), 225–239. <https://doi.org/10.3233/JPB-120064>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Espinosa-García, C., Fuentes-venado, C. E., Segura-uribe, C. G. J., Chávez-gutiérrez, E., Dalet, E., Angélica, F. N., & Cruz, E. (2020). Sex differences in the performance of cognitive tasks in a murine model of metabolic syndrome.

European Journal of Neuroscience., 00, 1–13.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14751>

- Feng, Y. L., & Tang, X. L. (2014). Effect of glucocorticoid-induced oxidative stress on the expression of Cbfa1. *Chemico-Biological Interactions*, 207(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.004>
- Fereja, T. H., Hymete, A., & Gunasekaran, T. (2013). A Recent Review on Chemiluminescence Reaction, Principle and Application on Pharmaceutical Analysis. *ISRN Spectroscopy*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/230858>
- Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., Singh, G. M., Gutierrez, H. R., Lu, Y., Bahalim, A. N., Farzadfar, F., Riley, L. M., & Ezzati, M. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet*, 377(9765), 557–567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62037-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62037-5)
- Foster, M. T., Shi, H., Softic, S., Kohli, R., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2017). Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity. *Diabetologia*, 54(11), 2890–2899. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2259-5>
- Fouret, G., Gaillet, S., Lecomte, J., Bonafos, B., Djohan, F., Barea, B., Badia, E., Coudray, C., & Feillet-Coudray, C. (2018). 20-Week follow-up of hepatic steatosis installation and liver mitochondrial structure and activity and their interrelation in rats fed a high-fat-high-fructose diet. *British Journal of Nutrition*, 119(4), 368–380. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003713>
- Frasca, D., Blomberg, B. B., & Paganelli, R. (2017). Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01745>
- Fraunberger, E. A., Scola, G., Laliberté, V. L. M., Duong, A., & Andreazza, A. C. (2016). Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4729192>
- Freedman, D. S., Wang, J., Thornton, J. C., Mei, Z., Sopher, A. B., Pierson, R. N., Dietz, W. H., & Horlick, M. (2009). Classification of body fatness by body mass index-for-age categories among children. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 163(9), 805–811. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.104>
- Fried, R. (1975). Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochimie*, 57(5), 657–660. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(75\)80147-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(75)80147-7)
- Gancheva, S., & Zhelyazkova-Savova, M. (2020). Are Bisphosphonates Associated with Adverse Metabolic and Cognitive Effects? A Study in Intact Rats and Rats Fed High-Fat High-Fructose Diet. *Calcified Tissue International*, 107(1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00684-5>

- García-Galbis, M. R., Gallardo, D. I., Martínez-Espinosa, R. M., & Soto-Méndez, M. J. (2021). Personalized diet in obesity: A quasi-experimental study on fat mass and fat-free mass changes. *Healthcare*, 9(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/healthcare9091101>
- Gardner, D., Hosking, J., Metcalf, B. S., Jeffery, A. N., Voss, L. D., & Wilkin, T. J. (2009). Contribution of early weight gain to childhood overweight and metabolic health: A longitudinal study (EarlyBird 36). *Pediatrics*, 123(1), e67-73. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1292>
- Gardner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(1), 65–86. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90102-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90102-0)
- Gianazza, E., Brioschi, M., Fernandez, A. M., & Banfi, C. (2019). Lipoxidation in cardiovascular diseases. *Redox Biology*, 23(101119), 1–22. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.redox.2019.101119>
- Gladding, J. M., Abbott, K. N., Antoniadis, C. P., Stuart, A., & Begg, D. P. (2018). The Effect of Intrahippocampal Insulin Infusion on Spatial Cognitive Function and Markers of Neuroinflammation in Diet-induced Obesity. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00752>
- Gomez-Pinilla, F., Cipolat, R. P., & Royes, L. F. F. (2021). Dietary fructose as a model to explore the influence of peripheral metabolism on brain function and plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1867(166036), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166036>
- Gonzales, M. M., Tarumi, T., Miles, S. C., Tanaka, H., Shah, F., & Haley, A. P. (2010). Insulin sensitivity as a mediator of the relationship between BMI and working memory-related brain activation. *Obesity*, 18(11), 2131–2137. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.183>
- González, N., Villegas, Z. M., Bris, A. G., Egido, J., & Lorenzo, Ó. (2017). Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0528-4>
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Guilbaud, A., Niquet-Leridon, C., Boulanger, E., & Tessier, F. J. (2016). How can diet affect the accumulation of advanced glycation end-products in the human body? *Foods*, 5(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods5040084>
- Hall, K., & Guo, J. (2016). Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the effects of Diet Composition. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.052.Obesity>
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?

Journal of Neurochemistry, 97(6), 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>

- Hannan, M. A., Dash, R., Sohag, A. A. M., Haque, M. N., & Moon, I. S. (2020). Neuroprotection Against Oxidative Stress: Phytochemicals Targeting TrkB Signaling and the Nrf2-ARE Antioxidant System. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00116>
- Hauer, H., & Brunner, S. (2015). Early fatty acid exposure and later obesity risk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(2), 113–117. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000143>
- Hawkins, M. A. W., Keirns, N. G., Baraldi, A. N., Layman, H. M., Stout, M. E., Smith, C. E., Gunstad, J., Hildebrand, D. A., Vohs, K. D., & Lovallo, W. R. (2021). Baseline associations between biomarkers, cognitive function, and self-regulation indices in the Cognitive and Self-regulatory Mechanisms of Obesity Study. *Obesity Science and Practice*, 7(6), 669–681. <https://doi.org/10.1002/osp4.537>
- Hughes, A. R., Sherriff, A., Lawlor, D. A., Ness, A. R., & Reilly, J. J. (2011). Timing of excess weight gain in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Pediatrics*, 127(3), e730–736. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-0959>
- Incollingo Rodriguez, A. C., Epel, E. S., White, M. L., Standen, E. C., Seckl, J. R., & Tomiyama, A. J. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.014>
- Jacklin, D. L., Cloke, J. M., Potvin, A., Garrett, I., & Winters, B. D. (2016). The dynamic multisensory engram: Neural circuitry underlying crossmodal object recognition in rats changes with the nature of object experience. *Journal of Neuroscience*, 36(4), 1273–1289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3043-15.2016>
- Janthakhin, Y., Kingtong, S., & Juntapremjit, S. (2022). Inhibition of glucocorticoid synthesis alleviates cognitive impairment in high-fat diet-induced obese mice. *Comprehensive Psychoneuroendocrinology*, 10(100130), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.cpneec.2022.100130>
- Ji, C., Dai, Y., Jiang, W., Liu, J., Hou, M., Wang, J., Burén, J., & Li, X. (2014). ScienceDirect Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(11), 1108–1116. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.010>
- Jové, M., Mota-Martorell, N., Pamplona, R., Pradas, I., Martín-Gari, M., & Ayala, V. (2020). The advanced lipoxidation end-product malondialdehyde-lysine in aging and longevity. *Antioxidants*, 9(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9111132>
- Kalivarathan, J., Chandrasekaran, S. P., Kalaivanan, K., Ramachandran, V., &

- Carani Venkatraman, A. (2017). Apigenin attenuates hippocampal oxidative events, inflammation and pathological alterations in rats fed high fat, fructose diet. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.162>
- Kalivarathan, J., Kalaivanan, K., Chandrasekaran, S. P., Nanda, D., Ramachandran, V., & Carani Venkatraman, A. (2020). Apigenin modulates hippocampal CREB-BDNF signaling in high fat, high fructose diet-fed rats. *Journal of Functional Foods*, 68(103898), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103898>
- Keaney, J. F., Larson, M. G., Vasan, R. S., Wilson, P. W. F., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J. M., Sutherland, P., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 434–439. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11>
- Kloet, A. D. De, Krause, E. G., Solomon, M. B., Flak, J. N., Scott, K. A., Kim, D., Myers, B., Ulrich-lai, Y. M., Woods, S. C., Seeley, R. J., & Herman, J. P. (2015). Adipocyte glucocorticoid receptors mediate fat-to-brain signaling. *Psychoneuroendocrinology*, 56, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.008>
- Kob, R., Bollheimer, L. C., Bertsch, T., Fellner, C., Djukic, M., Sieber, C. C., & Fischer, B. E. (2015). Sarcopenic obesity: molecular clues to a better understanding of its pathogenesis? *Biogerontology*, 16(1), 15–29. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9539-7>
- Kumar, S., & Kelly, A. S. (2017). Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(2), 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.017>
- Labban, R. S. M., Alfawaz, H., Almnaizel, A. T., Hassan, W. M., Bhat, R. S., Moubayed, N. M. S., Bjørklund, G., & El-Ansary, A. (2020). High-fat diet-induced obesity and impairment of brain neurotransmitter pool. *Translational Neuroscience*, 11(1), 147–160. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2020-0099>
- Le Gal, K., Schmidt, E. E., & Sayin, V. I. (2021). Cellular redox homeostasis. *Antioxidants*, 10(9), 1–7. <https://doi.org/10.3390/antiox10091377>
- Lee, K. H., Cha, M., & Lee, B. H. (2020). Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–29.
- Legeza, B., Marcolongo, P., Gamberucci, A., Varga, V., Bánhegyi, G., Benedetti, A., & Odermatt, A. (2017). Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Nutrients*, 9(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu9050426>
- Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., & Faria, A. (2016). *High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat*. 5(1), 11–21. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723>

- Leloup, C., Casteilla, L., Carrie, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., & Pe, L. (2011). Balancing Mitochondrial Redox Signaling: A Key Point in Metabolic Regulation. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, *14*(3), 519–530. <https://doi.org/10.1089=ars.2010.3424>
- Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Nascimento, A. F., Luvizotto, R. A. M., Sugizaki, M. M., Campos, D. H. S., Da Silva, D. C. T., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2016). Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *49*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155028>
- Letra, L., Santana, I., & Seiça, R. (2014). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: the role of adipocytokines. *Metabolic Brain Disease*, *29*(3), 563–568. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9501-z>
- Li, Y., Dai, Q., Jackson, J. C., & Zhang, J. (2008). Overweight is associated with decreased cognitive functioning among school-age children and adolescents. *Obesity*, *16*(8), 1809–1815. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.296>
- Lima, T. da R., Voltarelli, F. A., Freire, L. S., da Silva, F. A., de Almeida, P. C., Ávila, E. T. P., de França, S. A., Pereira, M. P., Damazo, A. S., Navalta, J. W., Fett, C. A., & Kawashita, N. H. (2021). High-fat diet and fructose drink introduced after weaning rats, induces a better human obesity model than very high-fat diet. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13671>
- Lin, C. I., Shen, C. F., Hsu, T. H., & Lin, S. H. (2017). A high-fructose-high-coconut oil diet induces dysregulating expressions of hippocampal leptin and stearoyl-CoA desaturase, and spatial memory deficits in rats. *Nutrients*, *9*(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu9060619>
- Liśkiewicz, A. D., Liśkiewicz, D., Marczak, Ł., Przybyła, M., Grabowska, K., Student, S., Dębiec, M., Sługocka, A., & Lewin-Kowalik, J. (2021). Obesity-associated deterioration of the hippocampus is partially restored after weight loss. *Brain, Behavior, and Immunity*, *96*, 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.05.030>
- Little, A. G., Pamenter, M. E., Sitaraman, D., Templeman, N. M., Willmore, W. G., Hedrick, M. S., & Moyes, C. D. (2021). Utilizing comparative models in biomedical research. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, *255*(110593), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110593>
- Liu, Z., Sun, Y., Qiao, Q., Zhao, T., Zhang, W., Ren, B., Liu, Q., & Liu, X. (2017). Sesamol ameliorates high-fat and high-fructose induced cognitive defects via improving insulin signaling disruption in the central nervous system. *Food and Function*, *8*(2), 710–719. <https://doi.org/10.1039/c6fo01562j>
- Livshits, G., & Kalinkovich, A. (2019). Inflammaging as a common ground for the development and maintenance of sarcopenia, obesity, cardiomyopathy and dysbiosis. *Ageing Research Reviews*, *56*(100980), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100980>

- López-Taboada, I., González-Pardo, H., & Conejo, N. M. (2020). Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Frontiers in Psychology*, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.564413>
- Loprinzi, P. D., & Frith, E. (2018). Obesity and episodic memory function. *Journal of Physiological Sciences*, *68*(4), 321–331. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0612-x>
- Lupien, S. J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., & Schramek, T. E. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition*, *65*(3), 209–237. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.02.007>
- Lupien, Sonia J., De Leon, M., De Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P. V., Thakur, M., McEwen, B. S., Hauger, R. L., & Meaney, M. J. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, *1*(1), 69–73. <https://doi.org/10.1038/271>
- Lupien, Sonia J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Lushchak, V. I., Duszenko, M., & Gospodaryov, D. V. (2021). Oxidative Stress and Energy Metabolism in the Brain : Midlife as a Turning Point. *Antioxidants*, *10*, 1–19. <https://doi.org/doi.org/10.3390/antiox10111715>
- Lutz, T. A. (2018). Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research. *Physiology and Behavior*, *192*, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.026>
- Lutz, T. A., & Woods, S. C. (2012). Overview of animal models of obesity. *Current Protocols in Pharmacology*, *SUPPL.58*, 1–22. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0561s58>
- Makhathini, K. B., Abboussi, O., Stein, D. J., Mabandla, M. V., & Daniels, W. M. U. (2017). Repetitive stress leads to impaired cognitive function that is associated with DNA hypomethylation, reduced BDNF and a dysregulated HPA axis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *60*, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.04.004>
- Mamo, J. C. L., Lam, V., Brook, E., Mooranian, A., Al-Salami, H., Fimognari, N., Nesbit, M. and Takechi, R. (2019). Probucol prevents blood–brain barrier dysfunction and cognitive decline in mice maintained on pro-diabetic diet. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *16*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1177/1479164118795274>
- Mamo, J. C. L., Lam, V., Giles, C., Coulson, S. H., Fimognari, N., Mooranian, A., Al-Salami, H., & Takechi, R. (2017). Antihypertensive agents do not prevent blood-brain barrier dysfunction and cognitive deficits in dietary-induced obese mice. *International Journal of Obesity*, *41*(6), 926–934. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.57>

- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., & Chrousos, G. P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18(5), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.004>
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., & Arrigo, T. (2015). Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>
- Martin, A. A., & Davidson, T. L. (2014). Human cognitive function and the obesogenic environment. *Physiology and Behavior*, 136, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.062>
- Martínez-Orozco, H., Reyes-Castro, L. A., Lomas-Soria, C., Sandoval-Salazar, C., Ramírez-Emiliano, J., Díaz-Cintra, S., & Solís-Ortiz, S. (2021). High-fat and combined high-fat – high-fructose diets impair episodic-like memory and decrease glutamate and glutamine in the hippocampus of adult mice. *Nutritional Neuroscience*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1977452> %0AHigh-fat
- Martínez-Orozco, H. (2020). *Efecto de la dieta alta en grasa y fructosa sobre la memoria de reconocimiento y su relación con el ciclo de GABA-Glutamina-Glutamato en la corteza prefrontal e hipocampo de ratones C57BL/6*. [Tesis de doctorado. Universidad de Guanajuato].
- Martinez, O. D. M., Theodoro, J. M. V., Grancieri, M., Toledo, R. C. L., De Barros, F. A. R., Tako, E., Queiroz, V. A. V., & Martino, H. S. D. (2021). Dry heated sorghum BRS 305 hybrid flour as a source of resistant starch and tannins improves inflammation and oxidative stress in Wistar rats fed with a high-fat high-fructose diet. *Food and Function*, 12(18), 8738–8746. <https://doi.org/10.1039/d1fo00802a>
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research and Clinical Practice*, 7(5), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>
- McCord, J. M. (1995). Superoxide Radical: Controversies, Contradictions, and Paradoxes. *Experimental Biology and Medicine*, 209(2), 112–117. <https://doi.org/10.3181/00379727-209-43885c>
- McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 3–23. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
- Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 80(2), 301–309. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652008000200008>

- Mi, Y., Qi, G., Fan, R., Qiao, Q., Sun, Y., Gao, Y., & Liu, X. (2017). EGCG ameliorates high-fat- and high-fructose-induced cognitive defects by regulating the IRS/AKT and ERK/CREB/BDNF signaling pathways in the CNS. *FASEB Journal*, 31(11), 4998–5011. <https://doi.org/10.1096/fj.201700400RR>
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., & Remacle, J. (1994). Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)
- Muhlhausler, B. S., Cook-Johnson, R., James, M., Miljkovic, D., Duthoit, E., & Gibson, R. (2010). Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2010, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2010/927836>
- Mulati, A., Ma, S., Zhang, H., Ren, B., Zhao, B., Wang, L., Liu, X., Zhao, T., Kamanova, S., Sair, A., Liu, Z., Liu, Z. and Liu, X. (2020). Sea-Buckthorn Flavonoids Alleviate High-Fat and High-Fructose Diet-Induced Cognitive Impairment by Inhibiting Insulin Resistance and Neuroinflammation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(21), 5835–5846. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00876>
- Mulati, A., Zhang, X., Zhao, T., Ren, B., Wang, L., & Liu, X. (2021). Isorhamnetin attenuates high-fat and high-fructose diet induced cognitive impairments and neuroinflammation by mediating MAPKs and NFκB signaling pathways. *Food Funct*, 4;12(19), 9261–9272. <https://doi.org/10.1039/D0FO03165H>
- Mulati, A., Zhang, X., Zhao, T., Ren, B., Wang, L., Liu, X., Lan, Y., & Xuebo, L. (2021). Isorhamnetin attenuates high-fat and high-fructose diet induced cognitive impairments and neuroinflammation by mediating MAPK and NFκB signaling pathways. *Food & Function*., 4;12(19), 9261–9272. <https://doi.org/10.1039/d0fo03165h>
- Mullins, C. A., Gannaban, R. B., Khan, M. S., Shah, H., Siddik, M. A. B., Hegde, V. K., Hemachandra Reddy, P., & Shin, A. C. (2020). Neural underpinnings of obesity: The role of oxidative stress and inflammation in the brain. *Antioxidants*, 9(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antiox9101018>
- Nabil, M., El Demellawy, M. A., Mahmoud, M. F., & Mahmoud, A. A. A. (2020). Prolonged overnutrition with fructose or fat induces metabolic derangements in rats by disrupting the crosstalk between the hypothalamus and periphery: Possible amelioration with fenofibrate. *European Journal of Pharmacology*, 879(173136), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173136>
- Naguib, Y. M., Samaka, R. M., Rizk, M. S., Ameen, O., & Motawea, S. M. (2021). Countering adipose tissue dysfunction could underlie the superiority of telmisartan in the treatment of obesity - related hypertension. *Cardiovascular Diabetology*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12933-021-01259-w>

- Naneix, F., Bakoyiannis, I., Santoyo-Zedillo, M., Bosch-Bouju, C., Pacheco-Lopez, G., Coutureau, E., & Ferreira, G. (2021). Chemogenetic silencing of hippocampus and amygdala reveals a double dissociation in periadolescent obesogenic diet-induced memory alterations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 178(1–11). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107354>
- Nestorov, J., Kovac, S., Elakovic, I., & Matic, G. (2014). Dietary fructose-related adiposity and glucocorticoid receptor function in visceral adipose tissue of female rats. *European Journal of Nutrition*, 53 (6), 1409–1420. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0644-1>
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., & Filip, M. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4094–4125. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9337-5>
- Noble, E. E., & Kanoski, S. E. (2016). Early life exposure to obesogenic diets and learning and memory dysfunction. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 9, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.11.014>
- Nota, M. H. C., Vreeken, D., Wiesmann, M., Aarts, E. O., Hazebroek, E. J., & Kiliaan, A. J. (2020). Obesity affects brain structure and function- rescue by bariatric surgery? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 108, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.025>
- Nuijten, M. A. H., Eijsvogels, T. M. H., Monpellier, V. M., Janssen, I. M. C., Hazebroek, E. J., & Hopman, M. T. E. (2022). The magnitude and progress of lean body mass, fat-free mass, and skeletal muscle mass loss following bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 23(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/obr.13370>
- Ogawa, T., Ohira, A., & Amemiya, T. (1997). Manganese and copper-zinc superoxide dismutases in the developing rat retina. *Acta Histochemica*, 99(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(97\)80002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(97)80002-5)
- Ojetola, A. A., Adeyemi, W. J., David, U. E., Ajibade, T. O., Adejumobi, O. A., Omobowale, T. O., Oyagbemi, A. A., & Fasanmade, A. A. (2021). D-ribose-L-cysteine prevents oxidative stress and cardiometabolic syndrome in high fructose high fat diet fed rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 142, 112017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112017>
- Ouakinin, S. R. S., Barreira, D. P., & Gois, C. J. (2018). Depression and Obesity: Integrating the Role of Stress, Neuroendocrine Dysfunction and Inflammatory Pathways. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00431>
- Page, K. C., Anday, E. K., & Page, K. C. (2020). Dietary Exposure to Excess Saturated Fat During Early Life Alters Hippocampal Gene Expression and Increases Risk for Behavioral Disorders in Adulthood. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.527258>
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular

- integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(10), 1249–1262. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.07.003>
- Pamplona, R., Barja, G. and, & Portero-Otín, M. (2002). Membrane Fatty Acid Unsaturation, Protection against Oxidative Stress, and Maximum Life Span A Homeoviscous-longevity Adaptation? *New York Academy of Sciences*, 959, 475–490. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02118.x>
- Pareek, V., Nath, B., & Roy, P. K. (2019). Role of Neuroimaging Modality in the Assessment of Oxidative Stress in Brain: A Comprehensive Review. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 18(5), 372–381. <https://doi.org/10.2174/1871527318666190507102340>
- Park, S. Y., Jung, H., Lin, Z., Hwang, K. T., & Kwak, H. K. (2021). Black raspberry (*Rubus occidentalis*) attenuates inflammatory markers and vascular endothelial dysfunction in Wistar rats fed a high-fat diet with fructose solution. *Journal of Food Biochemistry*, 45(10), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13917>
- Payant, M. A., & Chee, M. J. (2021). Neural mechanisms underlying the role of fructose in overfeeding. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 128, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.034>
- Pérez-garcía, G., Guzmán-quevedo, O., Da, R., Aragão, S., & Bolaños-jiménez, F. (2016). Early malnutrition results in long- lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Nature Publishing Group*, 6(21275), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep21275>
- Poon, H. F., Calabrese, V., Scapagnini, G., & Butterfield, D. A. (2004). Free radicals: Key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(5), 478–493. <https://doi.org/10.1093/gerona/59.5.m478>
- Porter, N. A., Caldwell, S. E., & Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30(4), 277–290. <https://doi.org/10.1007/BF02536034>
- Prasad, S., Muralidhar, M. N., Yadav, D. M. D., Kondeti, S., & Kalashikam, R. R. (2020). Strain specific variation underlines the disparity in stress response of rats to calorie dense diets in the pathophysiology of obesity. *Steroids*, 160(January), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108653>
- Pratt, D. A., Tallman, K. A., & Porter, N. A. (2011). Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Accounts of Chemical Research*, 44(6), 458–467. <https://doi.org/10.1021/ar200024c>
- Preston, A. R., & Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current Biology*, 23(17), R764–R773. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.041>

- Prickett, C., Brennan, L., & Stolwyk, R. (2014). Examining the relationship between obesity and cognitive function: A systematic literature review. *Obesity Research and Clinical Practice*, 9(2), 93–113. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2014.05.001>
- Prince, P. D., Santander, Y. A., Gerez, E. M., Höcht, C., Polizio, A. H., Mayer, M. A., Taira, C. A., Fraga, C. G., Galleano, M., & Carranza, A. (2017). Fructose increases corticosterone production in association with NADPH metabolism alterations in rat epididymal white adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.021>
- Prodam, F., Ricotti, R., Agarla, V., Parlamento, S., Genoni, G., Balossini, C., Walker, G. E., Aimaretti, G., Bona, G., & Bellone, S. (2013). High-end normal adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels are associated with specific cardiovascular risk factors in pediatric obesity: A cross-sectional study. *BMC Medicine*, 11(44), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-44>
- Puigoriol-Illamola, D., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Leiva, R., Vázquez, S., & Pallàs, M. (2018). 11 β -HSD1 Inhibition by RL-118 Promotes Autophagy and Correlates with Reduced Oxidative Stress and Inflammation, Enhancing Cognitive Performance in SAMP8 Mouse Model. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 8904–8915. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1026-8>
- Ren, X., Zou, L., Zhang, X., Branco, V., Wang, J., Carvalho, C., Holmgren, A., & Lu, J. (2017). Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxidants and Redox Signaling*, 27(13), 989–1010. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6925>
- Rivera, J. A., Barquera, S., González-Cossío, T., Olaiz, G., & Sepúlveda, J. (2004). Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutrition Reviews*, 62(7 II), 8–12. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00086.x>
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition and Diabetes*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
- Rodríguez-González, G. L., Vega, C. C., Boeck, L., Vázquez, M., Bautista, C. J., Reyes-Castro, L. A., Saldaña, O., Lovera, D., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2015). Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *International Journal of Obesity*, 39(4), 549–556. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.209>
- Rodríguez-González, Guadalupe L., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Beltrán, A. A., Ibáñez, C. A., Vega, C. C., Lomas-Soria, C., Castro-Rodríguez, D. C., Elías-López, A. L., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2019). Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. *Journal of Physiology*, 597(23), 5549–5563. <https://doi.org/10.1113/JP278232>
- Rosini, T. C., Ramos da Silva, A. S., & de Moraes, C. (2012). Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista Da Associação*

- Médica Brasileira (English Edition)*, 58(3), 383–387.
[https://doi.org/10.1016/s2255-4823\(12\)70211-4](https://doi.org/10.1016/s2255-4823(12)70211-4)
- Ruszkiewicz, J., & Albrecht, J. (2015). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochemistry International*, 88, 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.012>
- Salminen, L. E., & Paul, R. H. (2014). Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: A theoretical review. *Reviews in the Neurosciences*, 25(6), 805–819. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0046>
- Sampaio, T. B., Marques, N. F., Binder, L. B., Tasca, C. I., & Prediger, R. D. (2020). Role of Prefrontal Cortex on Recognition Memory Deficits in Rats following 6-OHDA-Induced Locus Coeruleus Lesion. *Hindawi*, 2020, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2020/8324565>
- Savas, M., Wester, V. L., Visser, J. A., Kleinendorst, L., Van Der Zwaag, B., Van Haelst, M. M., Van Den Akker, E. L. T., & Van Rossum, E. F. C. (2019). Extensive Phenotyping for Potential Weight-Inducing Factors in an Outpatient Population with Obesity. *Obesity Facts*, 12(4), 369–384.
<https://doi.org/10.1159/000499978>
- Savaskan, N. E., Borchert, A., Bräuer, A. U., & Kuhn, H. (2007). Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: Specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(2), 191–201.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.033>
- Savini, I., Gasperi, V., & Catani, M. V. (2016). Oxidative Stress and Obesity. In *Obesity* (pp. 65–86). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-19821-7_6
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H., & Paul, B. D. (2019). Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 30(11), 1450–1499.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7321>
- Schmitz, S. M. T., Schooren, L., Kroh, A., Koch, A., Stier, C., Neumann, U. P., Ulmer, T. F., & Alizai, P. H. (2021). Association of body composition and sarcopenia with nash in obese patients. *Journal of Clinical Medicine*, 10(15).
<https://doi.org/10.3390/jcm10153445>
- Schneider, C. (2010). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol Nutr Food Res*, 53(1), 315–321.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200800131>
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00061-0](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00061-0)

- Shamah, T., Cuevas, L., Romero, M., Gaona, E. B., & Gómez Acosta, Luz María Mendoza, Laura Rosario Alvarado, Méndez Gómez Humarán, Ignacio Rivera Dommarco, J. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. *Instituto Nacional de Salud Pública*, 23–126.
- Shapiro, A., Mu, W., Roncal, C., Cheng, K. Y., Johnson, R. J., & Scarpace, P. J. (2008). Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. In *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (Vol. 295, Issue 5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00195.2008>
- Spencer, S. J., Korosi, A., Layé, S., Shukitt-hale, B., & Barrientos, R. M. (2017). Food for thought : how nutrition impacts cognition and emotion. *Npj Science of Food*, July, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0008-y>
- Spiers, J. G., Chen, H. C., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2015). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in Neuroscience*, 8(January), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00456>
- Spijker, S. (2011). Dissection of rodent brain regions. In K. Li (Ed.), *Neuroproteomics* (pp. 13–26). Humana pres. https://doi.org/2443/10.1007/978-1-61779-111-6_2
- States, U. (2005). Comparing rat ' s to human ' s age : How old is my rat in people years ? *Editorial Opinion / Nutrition*, 21, 775–777. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.04.002>
- Steckler, T., Drinkenburg, W. H. I. M., Sahgal, A., & Aggleton, J. P. (1998). RECOGNITION MEMORY IN RATS---II . NEUROANATOMICAL SUBSTRATES. *Progress in Neurobiology*, 54(97).
- Structure, A. R., Kroll, D. S., Feldman, D. E., Biesecker, C. L., Mcpherson, K. L., Manza, P., Joseph, P. V., Volkow, N. D., & Wang, G. (2020). Neuroimaging of Sex / Gender Di ff erences in Obesity : A review of structure, function, and neurotransmission. *Nutriens*, 1–23. <https://doi.org/10.3390/nu12071942>
- Sugar, J. and M.-B. M. (2019). Episodic memory : Neuronal codes for what , where , and when Jørgen Sugar. *Hippocampus*, 201929, 1190–1205. <https://doi.org/10.1002/hipo.23132>
- Suleiman, J. B., Mohamed, M., & Bakar, A. B. A. (2020). A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(1), 103–114. <https://doi.org/10.5455/JAVAR.2020.G399>
- Sulistyowati, E., Handayani, D., Soeharto, S., & Rudijanto, A. (2021). A high-fat and high-fructose diet lowers the cecal digesta's weight and short-chain fatty acid level of a Sprague–Dawley rat model. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.3906/sag-1911-14>
- Suzuki, R. (2020). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Journal*

of Tokyo Medical University, 60(10), s20-29.
<https://doi.org/10.1301/002966402320634797>

- Symonds, M. E., Sebert, S. P., Hyatt, M. A., & Budge, H. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(11), 604–610. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.195>
- Takechi, R., Lam, V., Brook, E., Giles, C., Fimognari, N., Mooranian, A., Al-Salami, H., Coulson, S. H., Nesbit, M., & Mamo, J. C. L. (2017). Blood-brain barrier dysfunction precedes cognitive decline and neurodegeneration in diabetic insulin resistant mouse model: An implication for causal link. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00399>
- Tam, B. T., Morais, J. A., & Santosa, S. (2020). Obesity and ageing: Two sides of the same coin. *Obesity Reviews*, 21(4), 1–21. <https://doi.org/10.1111/obr.12991>
- Tan, B. L. and N. M. E. (2019). Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients*, 11, 1–22. <https://doi.org/10.3390/nu11112579>
- Tatomir, A., Micu, C., & Crivii, C. (2014). The impact of stress and glucocorticoids on memory. *Clujul Medical*, 87(1), 3–6. <https://doi.org/10.15386/cjm.2014.8872.871.at1cm2>
- Torres, D. J., Alfulaij, N., & Berry, M. J. (2021). Stress and the Brain: An Emerging Role for Selenium. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.666601>
- Trim, W., Turner, J. E., Thompson, D., & Thompson, D. (2018). Parallels in immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. *Frontiers in Immunology*, 9(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00169>
- Tunc, O., Bakos, H. W., & Tremellen, K. (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*, 43(2), 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.01032.x>
- Vaidya, R. B. and A. (2016). Cortisol dysregulation in obesity-related metabolic disorders. *Renal Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000152>.Cortisol
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Van de Heijning, B. J. M., Oosting, A., Kegler, D., & Van der Beek, E. M. (2017). An increased dietary supply of medium-chain fatty acids during early weaning in rodents prevents excessive fat accumulation in adulthood. *Nutrients*, 9(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu9060631>
- van Son, J., Koekkoek, L. L., Fleur, S. E. L., Serlie, M. J., & Nieuwdorp, M. (2021). The role of the gut microbiota in the gut–brain axis in obesity: Mechanisms and

- future implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22062993>
- Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2015). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal of Obesity*, 39(4), 712–719. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.150>
- Wahid, R. M., Samy, W., & El-sayed, S. F. (2021). Cognitive impairment in obese rat model: role of glial cells. *International Journal of Obesity*, 45(10), 2191–2196. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00880-9>
- Wake, D. J., Homer, N. Z. M., Andrew, R., & Walker, B. R. (2006). Acute in vivo regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity by insulin and intralipid infusions in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(11), 4682–4688. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0819>
- Wang, J., Wang, Z., Li, B., Qiang, Y., Yuan, T., Tan, X., Wang, Z., Liu, Z., and Liu, X. (2019). Lycopene attenuates western-diet-induced cognitive deficits via improving glycolipid metabolism dysfunction and inflammatory responses in gut–liver–brain axis. *International Journal of Obesity*, 43(9), 1735–1746. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0277-9>
- Wang, T., Yan, H., Lu, Y., Li, X., Wang, X., Shan, Y., Yi, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Anti-obesity effect of *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and *Lactobacillus crustorum* MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. *European Journal of Nutrition*, 59(6), 2709–2728. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02117-y>
- Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.050>
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2010). Neuropsychologia Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia*, 48(8), 2262–2272. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.12.022>
- Wayhart, J. P., & Lawson, H. A. (2017). Animal Models of Metabolic Syndrome. In *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition* (Second Ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00009-7>
- Weisiger, R.A., & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (13), 4793–4796.

- Willeumier, K. C., Taylor, D. V., & Amen, D. G. (2011). Elevated BMI is associated with decreased blood flow in the prefrontal cortex using SPECT imaging in healthy adults. *Obesity*, *19*(5), 1095–1097. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.16>
- Williams, L. R., & Leggett, R. W. (1989). Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clinical Physics and Physiological Measurement*, *10*(3), 187–217. <https://doi.org/10.1088/0143-0815/10/3/001>
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*(5), 1055–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>
- Witte, A. V., Köbe, T., Graunke, A., Schuchardt, J. P., Hahn, A., Tesky, V. A., Pantel, J., & Flöel, A. (2016). Impact of leptin on memory function and hippocampal structure in mild cognitive impairment. *Human Brain Mapping*, *37*(12), 4539–4549. <https://doi.org/10.1002/hbm.23327>
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., Alessio, D. D., & Tso, P. (2003). Nutrient Metabolism A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *Nutrient Metabolism*, *133*(4), 1081–1087. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1081>
- World Health Organization. (2021). *Obesity and overweight*. Obesity and Overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, J. Q., Peters, G. J., Rittner, P., Cleland, T. A., & Smith, D. M. (2015). The hippocampus, medial prefrontal cortex and selective memory retrieval: Evidence from a rodent model of the retrieval-induced forgetting effect. *Hippocampus*, *24*(9), 1070–1080. <https://doi.org/10.1002/hipo.22291>.The
- Yaribeygi, H., Panahi, Y., Javadi, B., & Sahebkar, A. (2018). The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *17*(3), 207–215. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180425122557>
- Yavas, E., Gonzalez, S., & Fanselow, M. S. (2019). Interactions between the hippocampus , prefrontal cortex , and amygdala support complex learning and memory [version 1 ; peer review : 3 approved]. *F1000Research*, *8*, 1–6.
- Yu, M., Huang, H., Dong, S., Sha, H., Wei, W., & Liu, C. (2019). High mobility group box-1 mediates hippocampal inflammation and contributes to cognitive deficits in high-fat high-fructose diet-induced obese rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *82*, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.08.007>
- Zambrano, E., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Chavira, R., & Nathanielsz, P. W. (2020). Aging Endocrine and Metabolic Phenotypes Are Programmed by Mother’s Age at Conception in a Sex-Dependent Fashion in the Rat. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *75*(12), 2304–2307. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa067>

Zanini, P., Arbo, B. D., Niche, G., Czarnabay, D., Benetti, F., Ribeiro, M. F., & Ceconello, A. L. (2017). Diet-induced obesity alters memory consolidation in female rats. *Physiology and Behavior*, *180*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.011>

14. Anexos

I. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Preparación de curva estándar

Para la realización de la curva estándar se utilizó albumina de suero bovino (ASB), la cual parte de un stock de 1 mg/ml de ASB, obteniéndose una dilución final de 200 µg/ml, de este volumen se tomó la cantidad correspondiente para cada punto de la curva (Tabla 8).

Tabla 8. Relación de volumen de dilución de ASB (200 µg/ml) y cantidad de proteína en cada punto de la curva estándar

Volumen ASB (µl)	Cantidad de ASB (µg/ml)
0	0
2	0.4
3	0.6
4	0.8
5	1
7.5	1.5
10	2
12.5	2.5

Preparación de reactivo de Bradford

Se preparó una disolución de 1:5 del reactivo de Bradford (Bio Rad, No. Cat. 500-006) con agua bidestilada (MilliQ), justo al momento de su utilización, manteniéndose en todo momento protegido de la luz.

Preparación de la muestra

Se descongeló en baño de hielo, una alícuota de 50 µl de homogenizado de tejido cerebral (hipocampo o CPF), conservado a una temperatura de -70°C. Posteriormente se realizó una dilución del homogenizado de tejido cerebral 1:20 con agua MilliQ y mezclándose en vórtex.

Lectura

En placa de 96 pozos se colocó 5 µl de la muestra diluida por duplicado, junto a las cuales se colocaron los puntos de la curva, la cual va de 0-12.5 µl. A continuación, se adicionó 200 µl del reactivo de Bradford y se incubó 5 min a temperatura

ambiente. Se leyó a una absorbancia de $\lambda=595$ nm en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK).

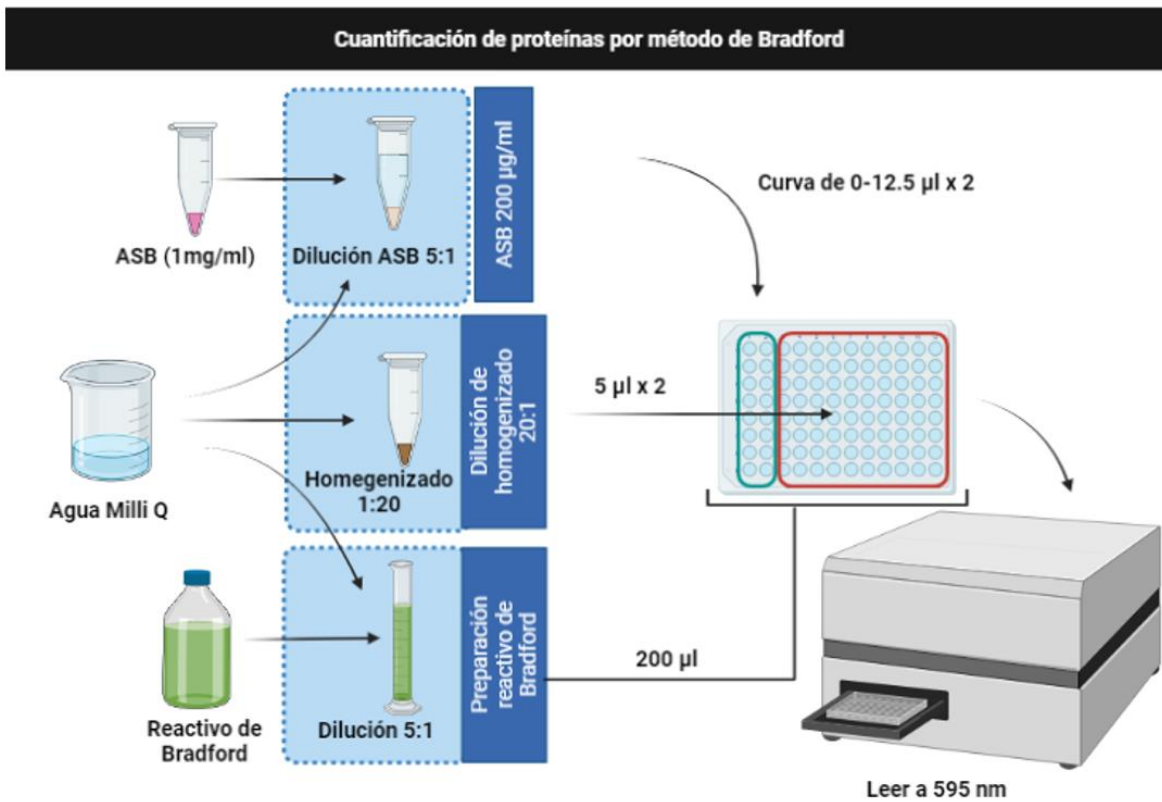


Figura 25. Esquema de los pasos a seguir para la determinación de concentración de proteínas por método de Bradford.

II. Determinación de TBARS

Preparación de reactivo C

Se prepararon (23 ml) de una mezcla de ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido clorhídrico (HCL) y ácido tricloroacético (TCA), Con el siguiente procedimiento:

Solución 1: Se pesaron 115 mg de TBA y se disolvieron en 200µl de HCl.

Solución 2: Se pesaron 3.6 g de ATC y se disolvieron en 10 ml de agua MilliQ.

Reactivo C: Se mezclaron las soluciones 1 y 2 agregando 10 ml de agua MilliQ lavado el vaso que contenía la solución 2, dejándose agitar hasta una solución homogénea, cubierto de la luz. Posteriormente se mantuvo en frío hasta su utilización.

Preparación de una solución de butilhidroxitolueno (BHT):

En tubo tipo Eppendorf cubierto de la luz, se pesaron 9.38 mg de BHT y se disolvieron con 1.5 ml de metanol (MeOH) grado reactivo. Después se almacenó en frío hasta el momento de su utilización.

Preparación de la muestra

Se tomaron 100 µl de suero o de homogenizado de tejido cerebral (según el análisis) en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se colocaron en frío. Posteriormente se adicionó 400 µl de reactivo C y se agitó en vórtex. A continuación de agregarón 5 µl de BHT y de igual forma se agito en vórtex. Después se incubaron las muestras a 50°C en horno, previamente calentado, durante 1 h. Al finalizar el tiempo de incubación las muestras se sometieron a choque térmico a 4°C durante 5 min para posteriormente se centrifugadas durante 15 min a 8,000 rpm a una temperatura de 4°C.

Lectura

Al terminar la centrifugación, se transfirió 180 µl del sobrenadante a placa de 96 pozos por duplicado y se leyó a una absorbancia de $\lambda=532$ nm en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK).

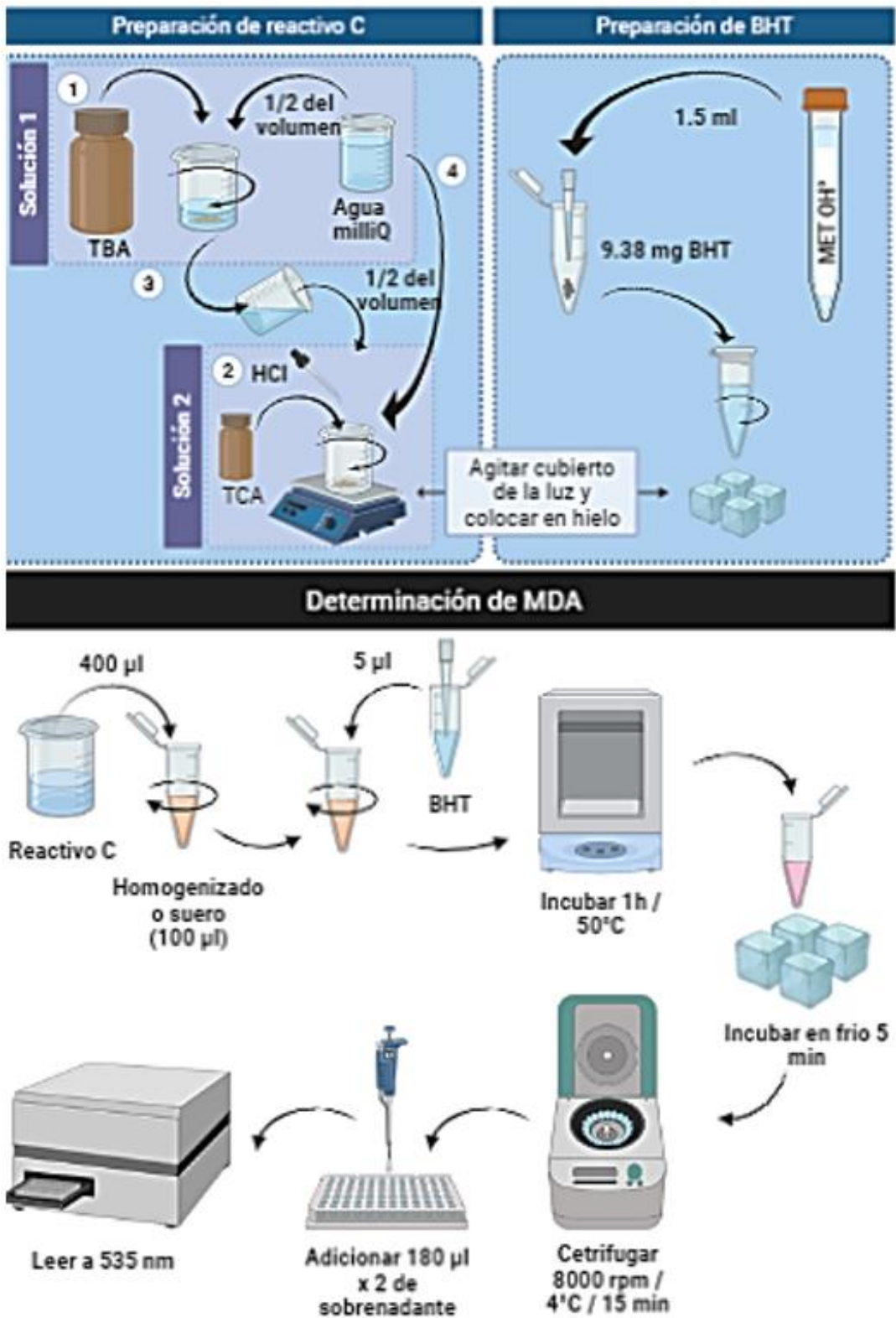


Figura 26. Diagramas del método de preparación de reactivo C, BHT y determinación de TBARS en homogenizado de tejido o suero.

III. Determinación de ERO

La determinación ERO se realizó por el método de DCF-DA (Cat No. SD 125). Los resultados fueron normalizados por la concentración de proteína.

Se preparo un amortiguador de TRIS-HEPES, 20 ml a una proporción de 18:1 (v/v) y 100 ml con una proporción de 9:1 (v/v) y se dejaron en frio hasta el momento de su utilización.

Preparación de curva estándar

Solución estándar 1: Se pesaron 4.0121 mg de 2,7-Diclorofluorosceína (DCF Cat No. 35848-25G) en tubo Eppendorf (cubierto de la luz) diluyéndose en 1 ml de MetOH grado HPLC y se colocó en frio.

Solución estándar 2: A 50 ml de amortiguador TRIS-HEPES 9:1 se le quitaron 0.5 ml y se adicionaron 0.5 ml de MeOH grado HPLC, mezclándose. Posterior a esto, se quitaron 5 µl de la solución y se agregaron 5 µl de la solución estándar 1 mezclándose hasta una solución homogénea. Todo el procedimiento se realizó cubierto de la luz.

Preparación de solución de trabajo C

Solución de trabajo A: Se pesaron 4.87 mg de DCF-DA en Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 1 ml de MetOH grado HPLC (cubierto de la luz), bien mezclado.

Solución de trabajo B: En tubo de ensayo se tomaron 50 µl de la solución de trabajo A y se agregaron 950 µl de MetOH grado HPLC (cubierto de la luz).

Solución de trabajo C: En otro tubo de ensayo cubierto de la luz se colocaron 600 µl de solución de trabajo B y se agregaron 5,400 µl de amortiguador 18:1.

Preparación de la muestra

Se descongelo una alícuota de 15 µl de homogenizado de tejido cerebral (hipocampo o CPF) conservado a una temperatura de -70°C en baño de hielo, protegiéndolo de la luz. Una vez descongelado se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4°C.

Lectura

En placa negra de 96 pozos sobre cama de hielo se pipeteo la curva estándar de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 9. Posteriormente se pipeteo 5 μ l del sobrenadante de las muestras por duplicado. A continuación, se colocaro 145 μ l del amortiguador TRIS-HEPPES 18:1 a las muestras. Finalmente se adicionó 50 μ l de la solución de trabajo C a todos los pozos (todo el procedimiento con la placa protegida de la luz).

Tabla 9. Concentración de DFC en cada punto de la curva, volumen a colar del amortiguador TRIS-HEPES 9:1 y solución estándar 2 de cada punto de la curva estándar.

Curva estándar	[DFC] (ng/200 μ l)	Amortiguador TRIS-HEPES 9:1 (μ l)	Solución estándar 2 (μ l)
1	0	200	0
2	0.16	198	2
3	0.2	195	5
4	0.4	190	10
5	0,8	180	20
6	1.6	160	40
7	2.4	140	60
8	3.2	120	80
9	4.0	100	100
10	4.8	80	120

A continuación, se leyó la placa en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK) incubándose durante 1 h a 37 °C con lecturas cada 15 min a una emisión de $\lambda=480$ nm y una extinción de $\lambda=525$ nm.

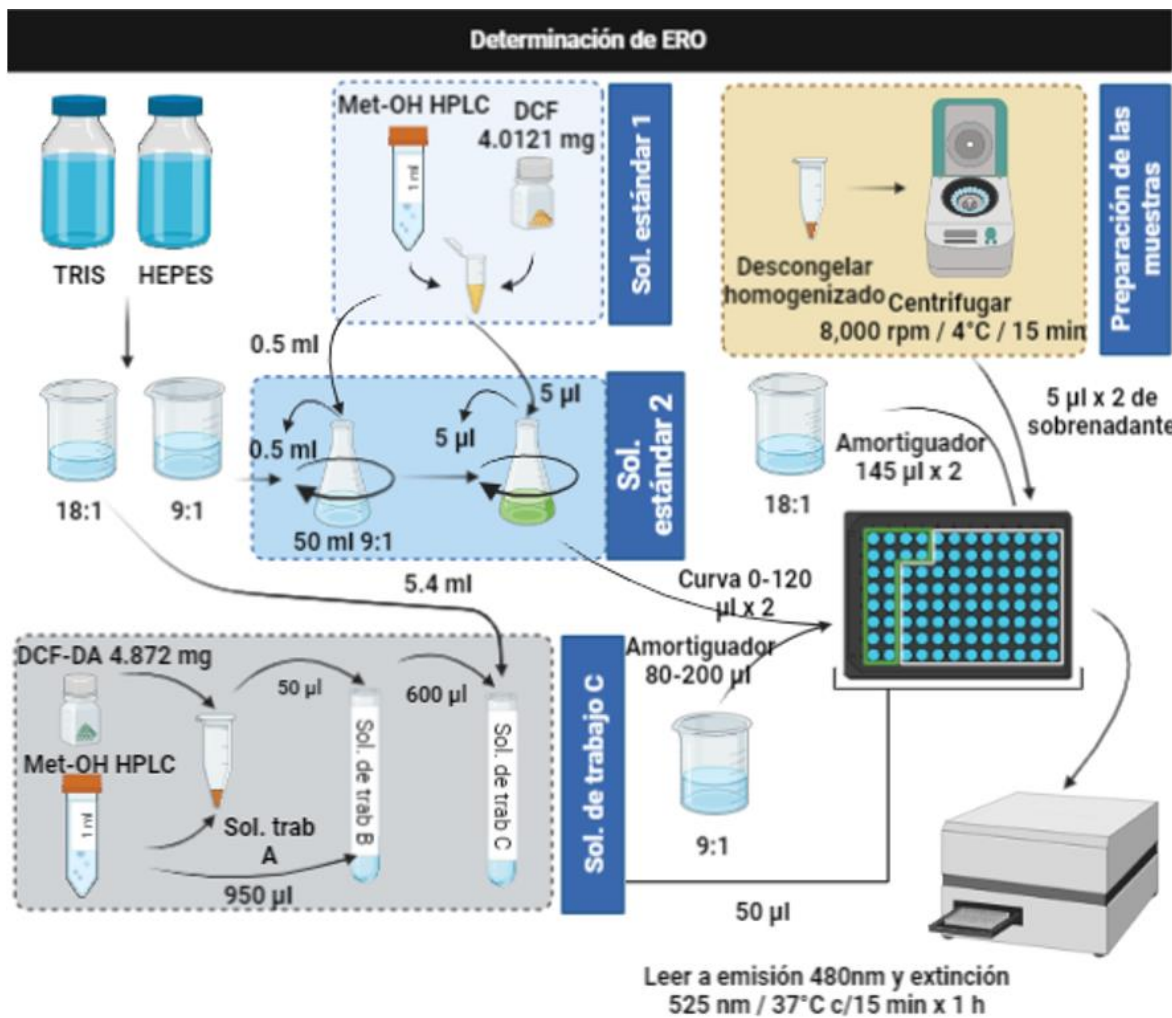


Figura 27. Diagrama que ilustra los pasos a seguir para la determinación de ERO por método de 2,7-Diclorofluoresceína. Todo el procedimiento se realiza cubierto por la luz.

IV. Medición de actividad de la SOD

La determinación de la actividad de la enzima SOD se realizó por medio del kit RANSOD de RANSOX (Cat No. SD 125). Los resultados fueron normalizados por la concentración de proteína.

Preparación de curva estándar

Se elaboro por diluciones seriadas, etiquetándose 6 tubos de ensayo comenzando con S6 y terminado en S1. Primeramente, se reconstituyo el calibrador (solución de la enzima SOD de origen bovino a una concentración de U/ml) con 10 ml de agua MilliQ mezclándose bien y se colocaron en el tubo S6. 5 ml de S6 se colocaron en el tubo S5 y se añadieron 5 ml de diluyente (0.01 mol/L de amortiguador de fosfato, pH 7.0) y se agito en vórtex. Del tubo S5 se tomaron 5 ml para ser colocados en S4 adicionándose 5 ml del diluyente y agitándose. En el tubo S3 se agregaron 5 ml de S4 junto con 5 ml del diluyente mezclándose bien. Del tubo S3 se tomaron 3 ml y se pusieron en S2 adicionando 6 ml del diluyente. Finalmente, S1 solo contenía 1 ml del diluyente Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de SOD y volúmenes para la realización de curva estándar para actividad de SOD

TUBO	U SOD/ML	VOLUMEN SOLUCIÓN ESTÁNDAR	VOLUMEN DE DILUYENTE
S6	5.67	5 ml	0
S5	2.83	5 ml (S6)	5 ml
S4	1.42	5ml (S5)	5ml
S3	0.71	5 ml (S4)	5ml
S2	0.24	3 ml (S3)	6 ml
S1	0	0	1 ml

Preparación de R1

Se reconstituyó el vial de sustrato mixto R1a (Xantina 0.05 mmol/l y cloruro de 2-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio [I.N.T] 0.025 mmol/l) agregando 20 ml del amortiguador R1b (CAPS 40 mmol/l, pH10.2; EDTA 0.94 mmol/l), mezclándose hasta una solución homogénea y posteriormente colocando se en hielo.

Preparación de R2

El vial R2 (Xantina oxidasa 80UI) se reconstituyó adicionando 10 ml de agua MilliQ, mezclándose bien y dejándose en frío hasta su utilización.

Preparación de la muestra

Se descongeló una alícuota de 50 μ l de homogenizado de tejido cerebral (hipocampo o CPF), conservado a una temperatura de -70°C en baño de hielo. Una vez descongelado se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4°C .

Lectura

En placa de 96 pozos en frío, se colocó 7.5 μ l del sobrenadante de la muestra y de cada uno de los tubos de la curva, por duplicado. Posteriormente se adicionaron 250 μ l de R1 y finalmente 37.5 μ l de R2. Se leyó en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK) a los 30 segundos, 1, 2 y 3 min a $\lambda = 505 \text{ nm}$ a 37°C .

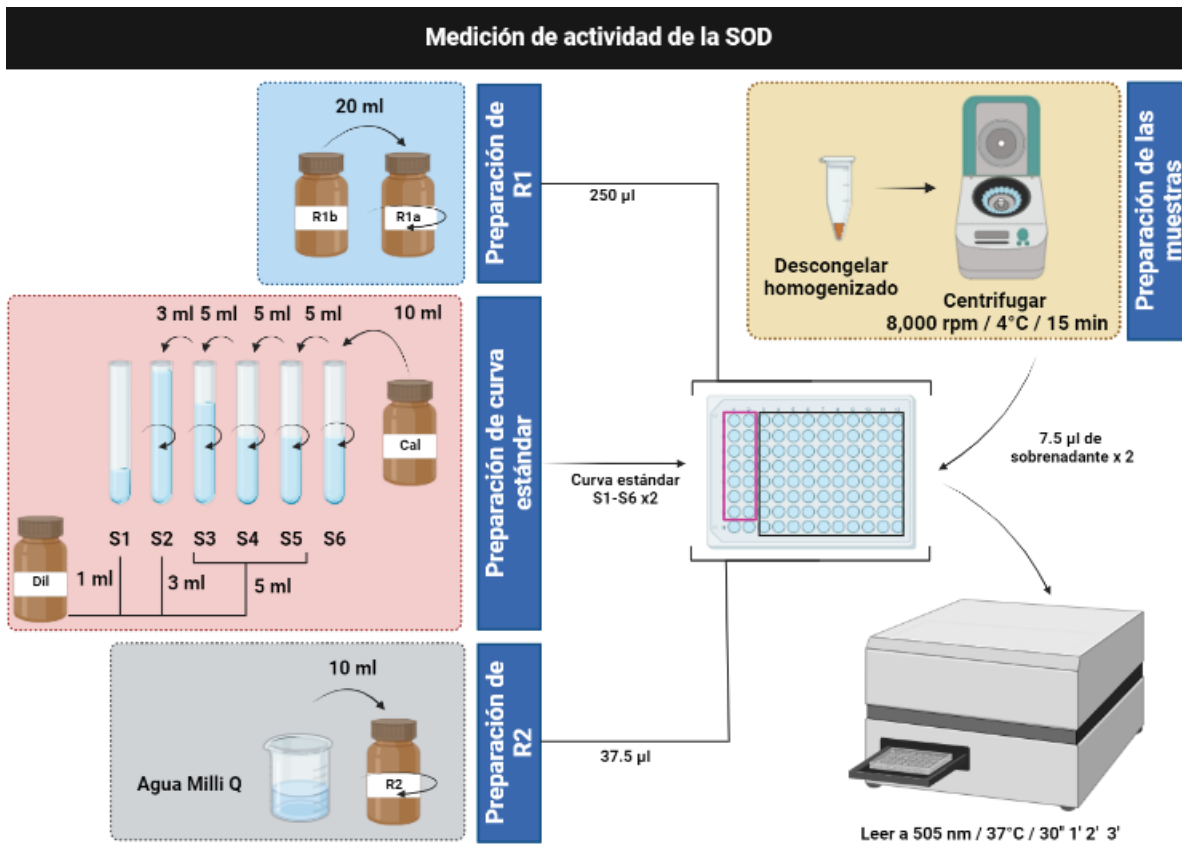


Figura 28. Diagrama donde se resume el método de preparación de los diferentes reactivos del kit RANSOD de RANSOX (Cat No. SD 125) para la medición de la actividad de la enzima SOD.

V. Medición de actividad de la GPx

La determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa se realizó por medio del kit RANSEL de RANSOX (Cat No. RS 504). Los resultados fueron normalizados por la concentración de proteína. Agitar hasta que sea homogéneo

Preparación de R1

Se reconstituyó el vial R1a (Glutatión 4 mmol/l; glutatión reductasa ≥ 0.5 ; NADPH 0.34 mmol/l) con 6.5 ml del amortiguador R1b (Amortiguador fosfato 0.05 mol/l, pH 7.2; EDTA 4.3 mmol/l) mezclándose en vórtex hasta una solución homogénea y colocándose en frío hasta el momento de su utilización.

Preparación de R2

Se agregó 10 μ l de hidroperóxido de cumene (0.18 mmol/l) a 10 ml de agua MilliQ y se agitó con agitador magnético hasta una mezcla homogénea, posteriormente se colocó en frío.

Lectura

Se descongeló una alícuota de 50 μ l de homogenizado de tejido cerebral, conservado a una temperatura de -70°C en baño de hielo y se centrifugo a 8,000 rpm durante 15 min a 4°C . El sobrenadante es el que se utilizó para el ensayo. Posteriormente se colocaron 7 μ l por duplicado en placa de 96 pozos. A la muestra se le agregó 350 μ l de R1 y 14 μ l de R2. Se leyó en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK) a los 30 segundos, 1, 2 y 3 min a $\lambda = 340 \text{ nm}$ a 37°C .

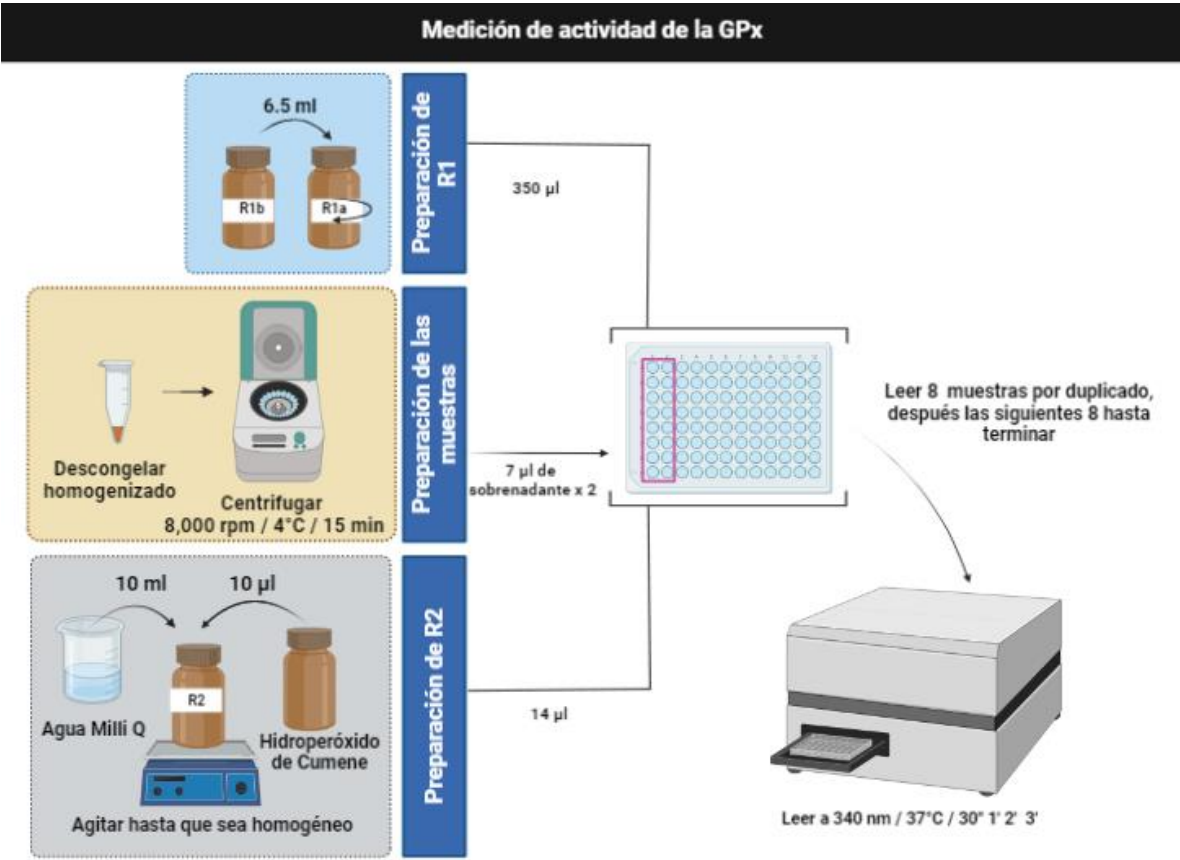


Figura 29. Diagrama donde se resume el método de preparación de los diferentes reactivos del kit RANSEL de RANSOX (Cat No. RS 504) para la medición de la actividad de la enzima GPx.

VI. Medición de actividad de la CAT

Para la determinación de la actividad de la catalasa en tejido cerebral (hipocampo y CPF) se preparó un amortiguador de fosfato potásico (KPBS) al 0.2 M con pH de 7.

Preparación de medio de reacción (MRe)

Stock madre (1): se disolvieron 100 μ l de una solución de H_2O_2 a una concentración de 301.3 mM en 99.9 ml de agua milliQ quedando una concentración final de 0.3 mM, protegido de la luz. Se hicieron alícuotas de 4 ml que se conservaron a $-70^\circ C$ hasta el momento de la realización del ensayo.

MRe: Se realizó al momento de realizar el ensayo: se descongeló una alícuota de stock 1 y se diluyó en 96 ml de KPBS para una concentración final de 12 μ M de H_2O_2 . Se mantuvo en frío y protegido de la luz hasta su utilización.

Lectura

Se descongeló una alícuota de 50 μ l de homogenizado de tejido cerebral en baño de hielo. A continuación, se centrifugó la muestra a 8,000 rpm a $4^\circ C$ durante 15 min, obteniéndose para el ensayo únicamente el sobrenadante. A una placa de 98 pozos se adicionó 10 μ l de muestra por duplicado y 250 μ l del MRe y se colocó de blanco el KPBS. Se leyó en lector multifuncional (Sinergy HT, BIOTEK) a los 30 segundos, 1,2 y 3 min a $\lambda = 240$ nm a $37^\circ C$.

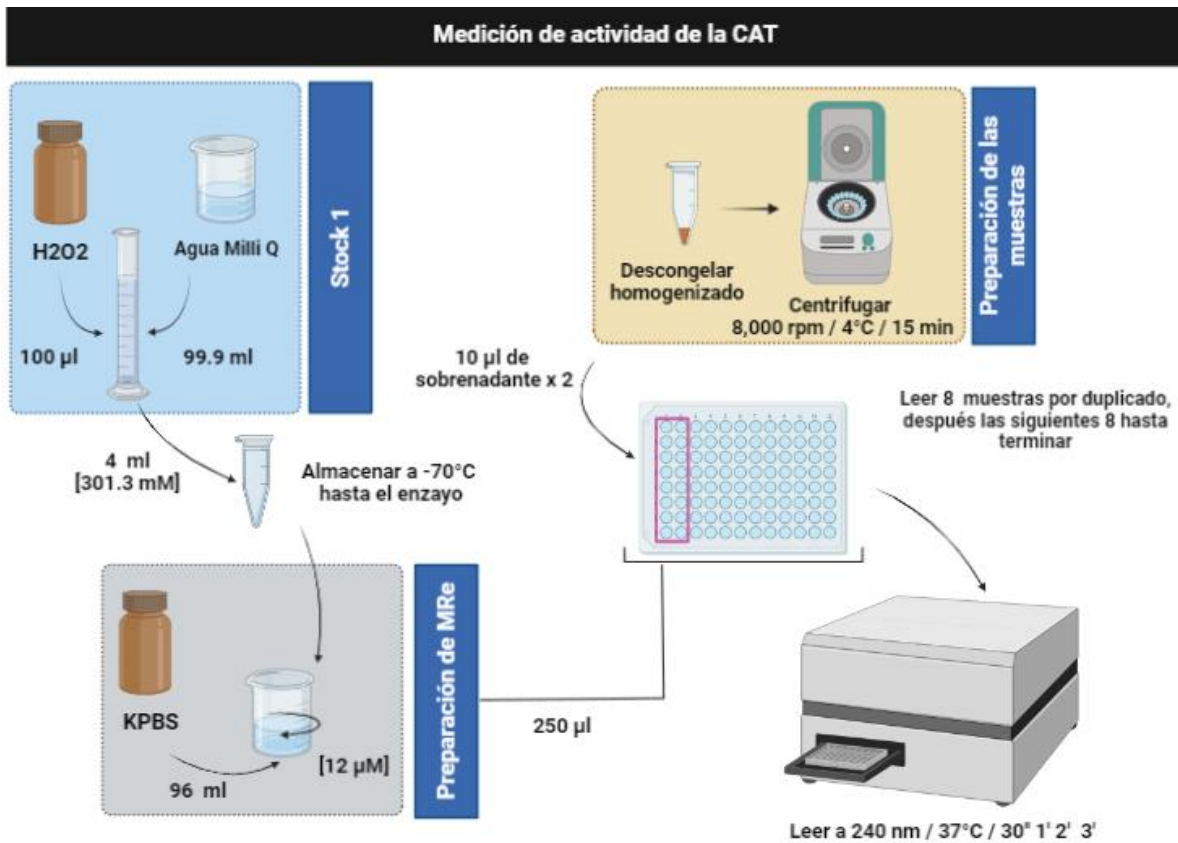


Figura 30. Diagrama donde se resume el método de preparación de los diferentes reactivos para la medición de la actividad de la enzima CAT.

VII. Expresión génica

Extracción de ácidos nucleicos

Se adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen™) a tubo tipo Eppendorf con tapón de rosca de 2 ml y 0.1 g de tejido a analizar (hipocampo o CPF). Las muestras se homogenizaron con un homogeneizador mini motorizado con pistilo de teflón (DWK Life Sciences; No. Cat. SCERSP749540-0000) este proceso se realizó todo en frío, al termino se incubaron 5 min a TA. Posteriormente se adicionó 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich), se mezcló por inversión y se incubaron 3 min a TA. Al finalizaron, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm 30 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo, pesipitando el ARN con 0.5 ml de alcohol isopropílico, mezclándose adecuadamente y se incubo toda la noche a -20°C. Después se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm 30 min a 4°C, se decantaron las muestras y se adicionó 1ml de etanol al 75%, repitiendo este procedimiento 2 veces más. Al finalizar el último lavado se dejó evaporar el etanol a TA boca abajo. Finalmente, se adicionó 20-50 µl de agua libre de RNAsas. La concentración (µg/µl), calidad y pureza del ARN se midió espectroscópicamente a 260/280 nm con BioDrop µLITE (©BioDrop Ltd No. Cat. 80-3006-55). Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta el momento de las síntesis de ADNc (Figura 30).

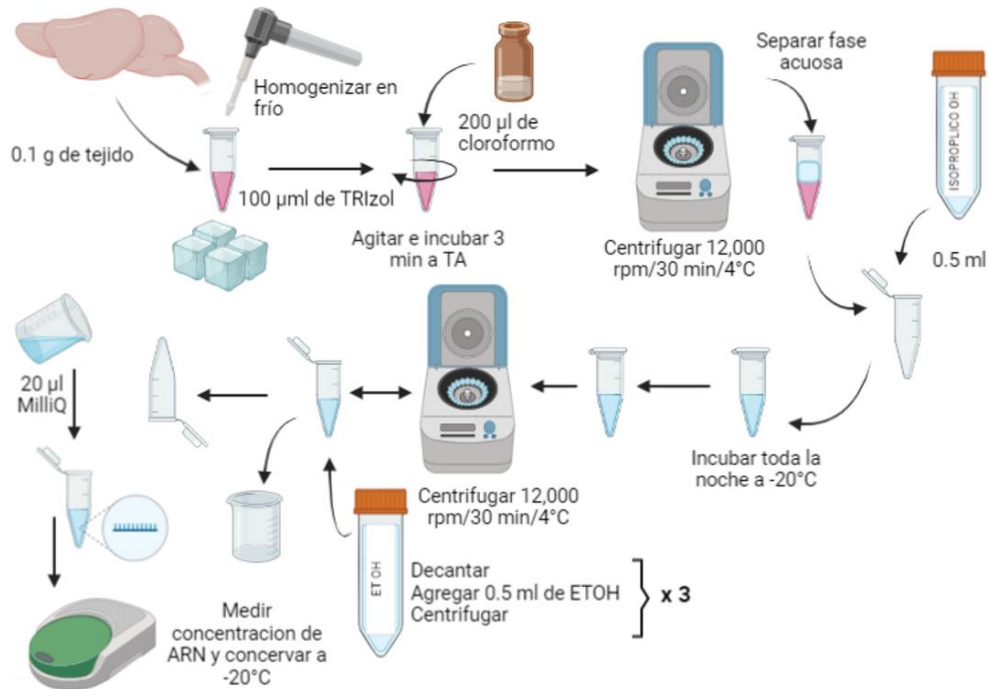


Figura 31. Diagrama donde se resume el método para la extracción de ARN con TRIzol.

Síntesis de ADNc

Una vez conocida la concentración de ARN de las muestras, se calculó el volumen requerido para una concentración de 3 µg y de agua bidestilada (MilliQ) necesaria para un volumen final de 14 µl. Se colocó estos dos volúmenes en tubos tipo Eppendorf de 0.2 ml

Preparación Mix Thermo: de acuerdo con las instrucciones del Kit de Transcriptor Frist Sttrand ADNc Synthesis (Roche Diagnostics Cat. No. 04 379 012 001) se preparó mezcla de enzimas: Maxima Enzyme Mix (2 µl por muestra) y 5x Reaction Mix (4 µl por muestra), de acuerdo con el volumen necesario para las muestras a procesar.

Se adicionó 6 µl de Mix Thermo para un volumen final de 20 µl, mezclándose adecuadamente. Se realizó la síntesis de ADNc en un termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (No. Cat. 4375305) con las siguientes condiciones:

10 min a 25 °C
 30 min a 50 °C
 5 min a 85 °C
 ∞ a 4°C

Las alícuotas se guardaron a -20 °C hasta el momento de la amplificación.

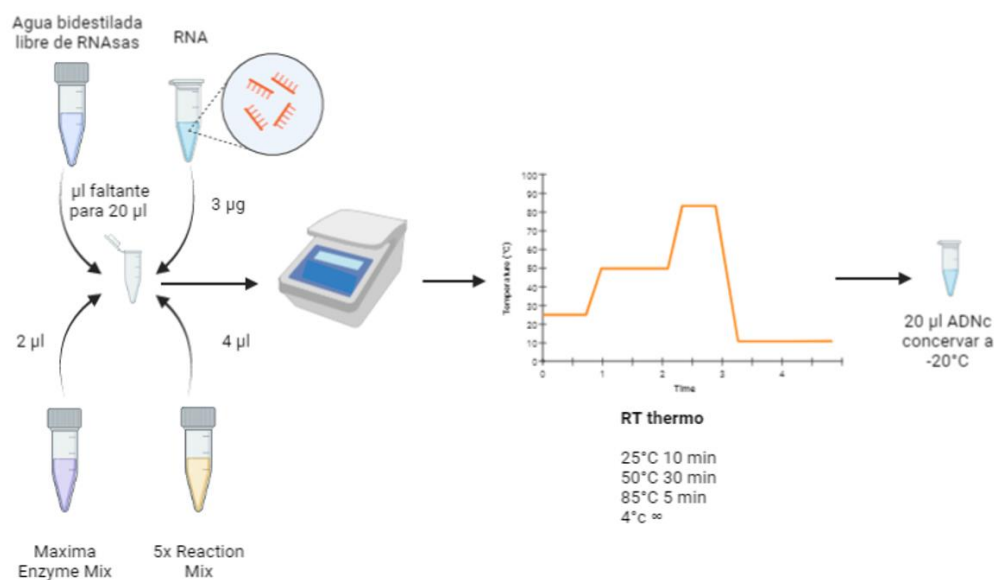


Figura 32. Esquema que resume el método para la síntesis de ADNc con Kit de Transcriptor Frist Sstrand ADNc Synthesis (Roche Diagnostics Cat. No. 04 379 012 001).

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Se descongelaron las muestras, los oligos *upp* y *down* del gen a analizar, la sonda específica (Roche) para los oligos y los reactivos 1 y 2 del Kit LightCycler TaqMan (No. Cat. 04535286001) almacenados a -20 °C. A continuación, se realizó una mezcla con el siguiente volumen por muestra a amplificar (se preparó suficiente volumen para las muestras a amplificar):

Tabla 11. Volumen de reactivos para PCR-TR por muestra a amplificar

Reactivo	Volumen (µl)
Reactivo 1 (Mix)	3.8
Reactivo 2 (H ₂ O)	4.9
Oligo <i>upp</i>	0.1
Oligo <i>down</i>	0.1
Sonda	0.1

En placa de 96 pozos en frío, se colocó 9 µl de la mezcla y posteriormente 1 µl de ADNc de cada muestra. Una vez cargada la placa se colocó adherente transparente

sobre los pozos para sellarlos y se centrifugó. La amplificación de los genes se realizó en un equipo LightCycler® 480 Instrument II, 96-well qPCR en tiempo real de Roche (Cat. No. 05 015 278 001) con las siguientes especificaciones: activación de Taq ADN polimerasa y la desnaturalización del ADN se realizó a 95°C durante 10 min seguido de 45 ciclos de amplificación (consistiendo en 10 s a 96 °C, 30 s a 60 °C y 1s a 72 °C.) Estas condiciones se utilizaron para todos los genes analizados.

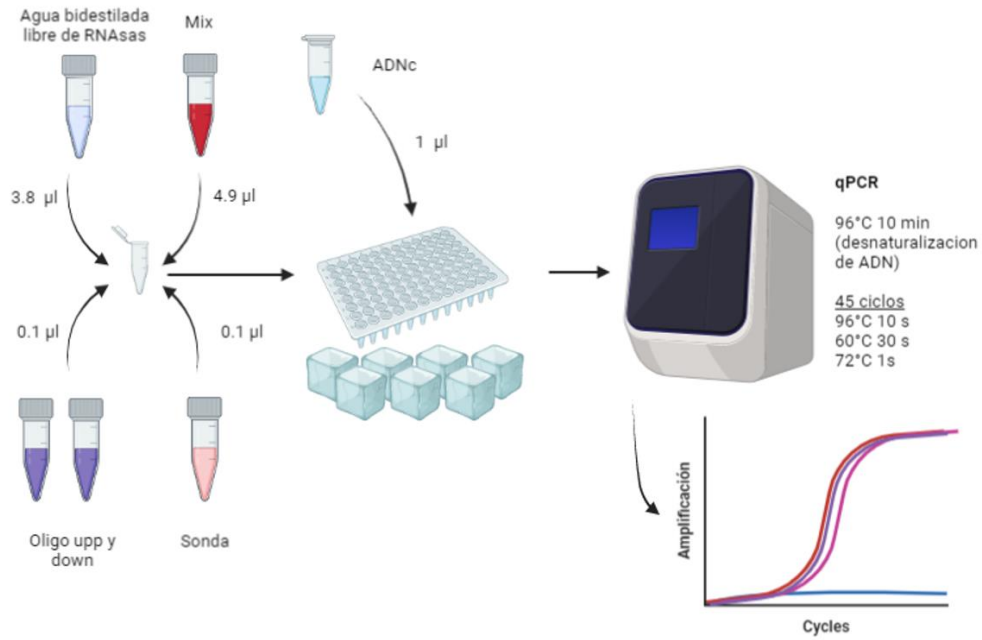


Figura 33. Esquema que resume el método para amplificación por PCR-TR con Kit LightCycler TaqMan (No. Cat. 04535286001)