



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Maestría en Ciencias Biomédicas

Laboratorio de Biología Molecular y Genómica



**Resistencia a la insulina cerebral y su relación con la resistencia a la insulina
periférica en un modelo in vivo de obesidad**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

QBP. Oscar Ezequiel Bahena Cuevas

Directora de tesis:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Codirector de tesis:

Dr. Manuel Sanchez Alavez

Chilpancingo Gro., a Junio del 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil veinte, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Resistencia a la insulina cerebral y su relación con la resistencia a la insulina periférica en un modelo *in vivo* de obesidad", presentada por el alumno Oscar Ezequiel Bahena Cuevas, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis

Dr. Manuel Sánchez Alavez
Codirección de tesis

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Donaciano Flores Robles

Dra. Mónica Ramírez Ruano

Vò. Bo



Dr. Oscar del Moral Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias
Biomédicas



Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Agradecimientos

A **DIOS**, por darme su amor y ser misericordioso conmigo, permitiéndome finalizar esta etapa de mi vida con salud y felicidad. Hizo realidad un sueño que anhele desde mi niñez, no me dejó solo e iluminó este camino con momentos de oscuridad.

A la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, por haberme dado su confianza y la oportunidad de seguir preparándome académicamente, por abrirme las puertas de su laboratorio y motivarme para seguir en este trabajo. Por los regaños, los aplausos y los momentos alegres que pasamos, es una gran mujer y gran ser humano de esos que es muy difícil encontrar.

Al **Dr. Manuel Sanchez Alavez** por todos los conocimientos que me transmitió, por el apoyo y la confianza la cual ayudó mucho para el aprendizaje de las técnicas que se usaron en los animales. Es una persona admirable, humilde y dedicada de la cual espero seguir aprendiendo y algún día poder llegar a ser un poco de lo que él es.

A la **Dra. en C. Martha Isela Barragán Bonilla** y al **M. en C. Juan Miguel Mendoza Bello**. Son enormes personas con un gran corazón y grandes valores. Aprendí mucho de ellos, no volveré a encontrar a gente igual y agradezco todos los conocimientos y enseñanzas que me ofrecieron.

A la **M. en C. Elena Salazar Hernández** por ayudarme en los experimentos, por todo el tiempo ofrecido en apoyo y motivación, el trato y la convivencia hicieron que las cosas salieran mejor.

A **mis sinodales**, por su apoyo en la realización de la tesis, por sus regaños, enseñanzas, colaboraciones y correcciones.

A todos mis tíos y tías, **en especial a mi Tío Felipe y mi Tía Tony**, que siempre me han apoyado en mi preparación académica, me han motivado a seguir adelante. Muchas gracias por aceptar ser mis padrinos en esta etapa importante de mi vida.

A **los ratones de experimentación**, por sus vidas que ofrecieron involuntariamente pero que fueron muy importantes para la realización de este trabajo. Todo mi respeto por todo lo que nos ofrecen y permiten aprender.

Oscar Bahena

Dedicatorias

A **mis padres**, Dora Cuevas Mazón y Teodosio Bahena Leyva, por darme la vida y nunca dejarme solo, por su total apoyo en la realización de esta maestría, por su amor, paciencia, por siempre creer en mí, porque han luchado y sufrido para que no me falte nada, los amo. Espero un día regresarles todo lo que me han dado.

A **mis hermanas**, Paula y Mayra, que son parte fundamental de mi vida, ellas siempre serán partes de mis triunfos, son mi apoyo para poder seguir avanzando, son por siempre mis amigas incondicionales, las amo.

A **mi adorada sobrinita**, que pueda ser para ella un ejemplo de dedicación y perseverancia, demostrarle que los sueños se cumplen y que debe de luchar por ellos. Te amare y cuidare de ti siempre.

A **mis abuelitos**, María Leyva Mastache y Agustín Cuevas Santana, porque en vida siempre fueron buenos conmigo, me apoyaron siempre, creyeron en mí, y me consintieron en cada momento de su vida. Espero que Dios permita que los vea de nuevo y pueda compartir con ustedes todo lo que aprendí y los valores que puse en práctica gracias a todas sus enseñanzas. Los amo y extraño todos los días, nunca me dejen solo.

A **Berenice Ramírez**, gracias por todo tu amor, eres una gran mujer que te mereces lo mejor. Siempre serás la mejor enfermera para mí que debe de luchar por sus sueños y claro que te apoyare en todo lo que necesites.

A **mis amigos**, Néstor López y Paco Mendoza, que a pesar de tener diferentes personalidades y gustos, siempre me ofrecieron su amistad sincera. Tengo la seguridad que siempre estarán cuando los necesite.

A **mi madrina**, Julia Bahena Leyva, por siempre apoyarme, por ser un pilar en mi vida, por su amor y confianza puesta en mí, espero seguir compartiendo más triunfos con ella.

A **Karem Cervantes**, mi mejor amiga. Mujer loca, divertida, sentida y enojona. Pero a pesar de todo, mujer que me escucha, apoya, motiva y que quiero con todo mi corazón. Gracias por todo pequeñita.

A **mis alumnos de Master Math**, me hicieron crecer académicamente con todas sus dudas y observaciones, gracias por todo su cariño y alegrarme en días donde las cosas no iban nada bien. Los llevo en mi corazón y espero que cumplan todas sus metas.

A **mi grupo Kairós**, gracias por orar por mí en todo momento, son personas increíbles de las que siempre aprendo cosas buenas, nunca saldrán de mi vida, los llevare a cualquier lado a donde vaya.

“El mundo nos dice que busquemos el éxito, el poder y el dinero; Dios nos dice que busquemos la humildad, el servicio y el amor”

Papa Francisco

Índice

I.	Resumen.....	6
II.	Abstract	7
III.	Introducción	8
IV.	Material y métodos.....	16
V.	Resultados	21
VI.	Discusión	28
VII.	Conclusión	33
VIII.	Bibliografía.....	34

I. Resumen

Introducción: La resistencia a la insulina (RI) es una condición que caracteriza a desórdenes metabólicos, como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, la cual ocasiona que los tejidos insulino-dependientes alteren su metabolismo por la falta de respuesta a la presencia del estímulo representado por la insulina. Recientemente se relacionó la RI en el cerebro con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en personas obesas, sin embargo no se conocen los mecanismos de daño que se derivan del establecimiento de resistencia a la insulina en el cerebro, y si predispone al establecimiento de alteraciones en tejido periférico, en obesidad, por tal motivo, el **objetivo** de nuestro estudio es determinar si el establecimiento de la resistencia a la insulina periférica (RIP) se relaciona con la presencia de resistencia a la insulina cerebral (RIC) en un modelo de obesidad. **Diseño y métodos de investigación:** El efecto de la administración de la dieta alta en grasas (HFD) sobre el establecimiento de la obesidad se determinó por la diferencia del 40% o más del peso corporal de los ratones con dieta estándar y baja en grasas (C y LFD). La RIP en ratones HFD se determinó por medición de los niveles de glucosa sanguínea, por incisión en la cola del ratón, cada 30 minutos después de la administración de glucosa e insulina. El efecto de la administración de insulina en el área preóptica sobre la temperatura corporal central en ratones se midió por radiotelemedría, para determinar el establecimiento de RIC. **Resultados:** Los ratones desarrollaron obesidad y ganancia de peso después de 1, 2 o 3 meses de haber consumido la dieta alta en grasas (HFD). Las curvas de tolerancia de glucosa (CTG) e insulina (CTI) mostraron que el grupo expuesto a la HFD por 3 meses, tuvo RIP al tercer mes de exposición, debido a que no disminuye el nivel de glucosa sanguínea cuando se administra insulina, en comparación con el grupo C y LFD. Por otro lado, la inyección de insulina en el área preóptica no induce respuesta a la insulina en los grupos LFD (al primer y segundo mes de dieta) lo que evidencia la presencia de RIC. La exposición a 10°C provocó hipotermia en los ratones C y LFD. **Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que una HFD provoca RIP, en tanto que la LFD provoca una RIC que es reversible con el tiempo.

Palabras clave: Insulina, resistencia a la insulina, obesidad, hipotálamo, POA, hipertermia.

II. Abstract

Introduction: Insulin resistance (IR) is a condition that characterizes metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes mellitus, which causes insulin-dependent tissues to alter their metabolism due to lack of response to the presence of the stimulus represented. by insulin. IR in the brain was recently related to the development of neurodegenerative diseases in obese people, however the mechanisms of damage that derive from the establishment of insulin resistance in the brain are not known, and whether it predisposes to the establishment of tissue alterations peripheral, in obesity, for this reason, the **objective** of our study is to determine if the establishment of peripheral insulin resistance (RIP) is related to the presence of cerebral insulin resistance (IQR) in an obesity model. **Research design and methods:** The effect of the administration of the high-fat diet (HFD) on the establishment of obesity was determined by the difference of 40% or more of the body weight of the mice on the standard low-fat diet (C and LFD). RIP in HFD mice was determined by measuring blood glucose levels, by incision in the tail of the mouse, every 30 minutes after administration of glucose and insulin. The effect of insulin administration in the preoptic area on core body temperature in mice was measured by radiotelemetry, to determine the establishment of IQR. **Results:** Mice developed obesity and weight gain 1, 2, and 3 months after consuming the high-fat diet (HFD). The glucose tolerance curves (CTG) and insulin (CTI) show that the group exposed to HFD had RIP at the third month of exposure, because the fasting glucose level during the CTG was above 150 mg / dl, in addition, the glucose level does not decrease when insulin is administered, compared to group C. On the other hand, the injection of insulin in the preoptic area does not induce an insulin response in the LFD groups (at the first and second month of diet) and HFD (at the third month), which shows the presence of IQR. Exposure to 10 ° C caused an increase in body temperature in the HFD group in the second month. **Conclusions:** Our results show that an HFD causes RIP and IQR, while LFD causes IQR in the first and second months.

Key words: Insulin, insulin resistance, obesity, hypothalamus, POA, hyperthermia.

III. Introducción

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial resultado de un consumo energético excesivo, en comparación con la energía requerida (Fernández-Sánchez, et al., 2011), lo que resulta en el aumento paulatino del peso corporal por aumento de tejido adiposo y una predisposición a la pérdida paulatina de los efectos reguladores fisiológicos de la Insulina. A nivel sistémico cuando la pérdida de sensibilidad a la insulina ocurre (resistencia a la insulina periférica), el efecto resultante es hiperglicemia seguido de hiperinsulinemia y aparición de un estado prediabético que son los factores de riesgo para un deterioro de la regulación energética y nutricional por parte del hipotálamo (ver Liu y cos, 2021) así como riesgo elevado de desarrollar un deterioro cognitivo (Kim y Feldman, 2015).

La insulina, secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, es una hormona peptídica que induce una variedad de respuestas anabólicas a la presencia de nutrientes, pero el principal efecto sistémico es el metabolismo de la glucosa y el control resultante de la glicemia (Kojta, et al., 2020) pero también tiene efectos diferentes al metabolismo de la glucosa tanto a nivel sistémico como en el sistema nervioso central.

-Mecanismos de liberación de insulina en el páncreas. Los niveles de glucosa en sangre están estrictamente controlados mediante la regulación de la liberación de insulina de las células β pancreáticas. Esta función homeostática depende de la captación de glucosa en las células β y las vías de señalización subsiguientes que influyen en la tasa de exocitosis de insulina (Schuit, et al., 2001).

Las células β pancreáticas expresan transportadores de glucosa GLUT2, que permiten una rápida captación de glucosa independientemente de la concentración de azúcar extracelular (Thorens, et al., 1988). A niveles bajos de glucosa (<50 mg / dl), se fosforila poco sustrato en las células β (Schuit, et al., 1999), probablemente debido a la baja expresión en estas células de isoformas de hexoquinasa de alta afinidad (hexoquinasa I, hexoquinasa II o hexoquinasa III [HK]), el cual da como resultado un flujo glucolítico bajo y niveles bajos de ATP (Huang y Hsu, 2004).

A niveles de glucosa >50 mg/dl las células β fosforilan la glucosa a través de la glucocinasa de alta afinidad (GK) (hexoquinasa IV). Un aumento agudo de la concentración de glucosa extracelular a 150 mg / dl de glucosa induce un aumento de ATP (Detimary, et al., 1998). El primer paso para la liberación de la insulina procede de los canales de K sensibles a ATP (KATP), que se cree que el aumento en la concentración de ATP estimula la liberación de insulina ya que provoca el cierre de los canales de KATP (Aguilar-Bryan y Bryan, 1999). La despolarización de la membrana que se produce tras el cierre de los canales KATP conducen a la apertura de canales de calcio dependientes del voltaje. El aumento de las concentraciones de calcio intracelular finalmente desencadena la fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana y la posterior liberación de su contenido (Ashcroft, et al., 1994; Röder, et al., 2016).

-Acciones de la Insulina en tejidos insulino dependientes y no dependientes

La insulina tiene efectos pleiotrópicos sobre múltiples órganos y ejerce sus efectos fisiológicos al unirse a su receptor [(IR, *Insulin Receptor*) Hubbard, 2013] transmembranal que pertenece a la clase de receptores tirosina cinasa y consiste en un receptor heterotetramérico formado por dos subunidades α extracelulares que tiene el sitio para ligandos endógenos que incluyen a la insulina, IGF-I and IGF-II., y dos subunidades β que atraviesan la membrana (Haeusler., et al, 2017) y tienen el sitio para la señalización intracelular. Hay dos isoformas del IR, A y B, pero la isoforma B es mucho más específica para la insulina, la cual es la isoforma que se expresa en hígado, músculo y tejido adiposo blanco y, por tanto, media la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina, donde uno de ellos es permitir la entrada de glucosa a la célula (Belfiore., et al, 2017).

-Acciones de la Insulina en musculo en reposo (tejidos insulino dependientes). En el músculo la insulina promueve la absorción de glucosa y su posterior oxidación en la glucolisis o la formación de glucógeno, gracias a que la insulina promueve la activación de AKT y con esto la translocación de GLUT-4 a la membrana celular y con esto permitir el paso de la glucosa hacia el interior celular lo que ayuda a la

disminución de los niveles de glucosa sanguínea (Lee y Lee, 2015; Patersen y Shulman, 2018).

-Acciones de la Insulina en tejido adiposo (tejidos insulino dependientes). En el tejido adiposo la insulina favorece el desplazamiento de GLUT4 a la membrana y aumenta la absorción de la glucosa y el metabolismo glucolítico y formación de glicerol-3-fosfato, absorción de ácidos grasos de cadena larga, la absorción de TG, la esterificación y el almacenamiento de lípidos y juega un papel en la regulación de la grasa corporal (Morigny y cols 2021).

En el hígado el transporte de glucosa no es insulino dependiente ya que los hepatocitos tienen GLUT-2, pero la influencia de la insulina es importante ya que cuando la insulina es alta predomina glucólisis, síntesis de glucógeno y lipogénesis, pero cuando los niveles de insulina son bajos se activan los mecanismos de glucogenólisis, gluconeogénesis hepática para mantener la glucosa fisiológica en plasma (Cherrington., et al, 1998; Aiston., et al, 2006).

También existen tejidos que no dependen de la insulina para absorber glucosa para su metabolismo celular, se incluyen al sistema nervioso central, epitelio intestinal, eritrocitos, tubulos renales y el mismo músculo solo durante el ejercicio. En estos tejidos la entrada de glucosa se lleva a través de otros transportadores de glucosa que siempre están presentes en la membrana y no dependen de su traslocación o de los niveles de insulina.

Definición de resistencia periférica a la insulina (o sistémica)

La resistencia a la insulina fue definida primero clínicamente como la inhabilidad de una cantidad conocida de insulina exógena o endógena de aumentar la absorción y la utilización de la glucosa en un individuo como lo haría en una población normal (Lebovitz, 2001). Es necesario aclarar que esta definición es con respecto al control glicémico pero al descubrirse que la insulina tiene efectos pleiotrópicos sobre múltiples órganos se planteó la posibilidad de que el defecto en su señal molecular también tenga una disminución de la función de su receptor.

El mecanismo molecular que subyace al desarrollo de la resistencia a la insulina es el deterioro de la vía de señalización de la insulina en las células que responden a la hormona (Kahn, et al., 2006; Biddinger y Kahn, 2006). La obesidad es una de las principales causas de alteración de la señalización de la insulina y, por tanto, del desarrollo de resistencia a la insulina. Hay muchas líneas de evidencia que sugieren que la inflamación inducida por la obesidad también puede ser una causa clave de resistencia a la insulina (Osborn y Olefsky, 2012).

El tejido adiposo de individuos obesos contienen cantidades elevadas de macrófagos activados clásicamente (M1), que producen mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF), la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y la interleucina 1 α [(IL-1 α) Jung, et al., 2018]. Estos macrófagos se activan por la unión de los ácidos grasos libres a los receptores 4 tipo Toll (TLR4), al unirse activan al factor nuclear kappa B (NF- κ B), que se transloca al núcleo para inducir la expresión de la interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estas citocinas son liberadas por los macrófagos y promueven en las células hepáticas, adiposas o musculares la activación de cinasas como c-Jun N-terminal (JNK/SAPK), lo que da como resultado un aumento en la fosforilación de serina superando y/o evitando las fosforilaciones en tirosina del IR, lo que desencadena la falta de unión del IR a la proteína denominada IRS, y el bloqueo de la vía de señalización de la insulina, generando el establecimiento de RI (Kim, et al., 2007; Lauterbach y Wunderlich, 2017).

Por otra parte los aminoácidos de cadena ramificada (ACR: leucina, isoleucina y valina) son aminoácidos esenciales que se han descrito en varias condiciones patológicas y fisiológicas, como la resistencia a la insulina (Asor, et al., 2015). El hígado metaboliza sólo una pequeña fracción de los ACR de la dieta; mientras que la mayor parte de ellos ingresa a la circulación sistémica para llegar a sus principales sitios de metabolismo, incluidos los músculos esqueléticos, el tejido adiposo y el cerebro, y, en sujetos obesos se encontraron niveles elevados de ACR en comparación con individuos sanos (Felig, et al., 1969). El mecanismo propone que un exceso de ACR activa la señalización de mTORC1, que promueve la resistencia

a la insulina a través de la fosforilación de la serina del sustrato del receptor de insulina IRS-1, por la liberación de citocinas proinflamatorias, mediadas por la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), lo que conduce a la resistencia a la insulina (Lynch Adams, 2014; Zhenyukh, et al., 2017).

En la obesidad inducida por hiperfagia, el exceso de glucosa se internaliza en el tejido adiposo blanco y es convertida en ácidos grasos que son almacenados, regularmente, en una sola gota de triglicéridos (Vishvanath y Gupta, 2019; Saltiel, 2015). Esto provoca que los adipocitos aumenten de tamaño (hipertrofia) debido al incremento de la deposición de triglicéridos dentro de estas células (Guilherme, et al., 2008). Los adipocitos hipertrofiados secretan proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), así como grandes cantidades de factor de necrosis tumoral α (TNF α) y otras citocinas como la interleucina-1 β (Lagathu, et al., 2006). La acción de tales citocinas provocan un aumento de la lipólisis dando como resultado un aumento de los niveles de acilglicerol (AGL) circulantes y la disponibilidad de triglicéridos para ser absorbidos directamente por órganos como el musculo e hígado, provocando un depósito de grasa ectópico (Lotta, et al., 2017).

Se ha descrito que este aumento de ácidos grasos libres puede ocasionar resistencia a la insulina (RI) (Arner y Rydén, 2015), ya que después de atravesar la membrana celular, los ácidos grasos se activan uniéndose a la coenzima A (CoA) en una reacción catalizada por la acil-CoA sintetasa (ACS), lo que da como resultado la formación de acil-CoA de cadena larga (LCACoA). Los ácidos grasos activados, en forma de LCACoA, son sustratos en la síntesis de novo de otros lípidos (triacilgliceroles, diacilgliceroles y ceramidas) o sufren una β -oxidación en las mitocondrias (Kojta, et al., 2020). Los LCACoAs activan algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), la jun cinasa (JNK) y el inhibidor del factor nuclear κ B (NF- κ B) cinasa- β (IKK β). Lo que da como resultado la fosforilación de serina en 307 (Ser307) en el sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1). Esta activación evita la fosforilación de tirosina en el receptor de insulina y, en consecuencia, la unión y activación de fosfoinositido 3-cinasas (PI3K) necesarias para la acción adecuada de la insulina (Franke, et al., 2003; Itani, et al., 2002).

Los ácidos grasos libres también pueden ser absorbidos directamente por órganos como el músculo e hígado, provocando un depósito de grasa ectópico (Lotta, et al., 2017). Cuando el hígado es resistente a la insulina, la supresión de la producción de glucosa hepática se altera y, por lo tanto, la gluconeogénesis y la glucogenólisis continúan activos y dan como consecuencia niveles de glucosa altos a pesar de los niveles de glucosa altos (Cherrington., et al, 1998; Aiston., et al, 2006). El músculo se ve afectado de manera similar por la resistencia a la insulina, aunque el problema aquí se relaciona más con la capacidad deteriorada de la insulina para promover la eliminación de glucosa mediante su oxidación en la glucólisis o la formación de glucógeno, lo cual provoca que los niveles de glucosa en sangre se mantengan elevados. Para compensar la resistencia a la insulina en estos tejidos, las células β pancreáticas producen más insulina (Lee y Lee, 2015; Patersen y Shulman, 2018).

Esta hiperglicemia e hiperinsulinemia provocada por la obesidad puede ocasionar que el cerebro reciba grandes cantidades de insulina y glucosa, pues ambas moléculas pueden ser transportadas e internalizadas en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica se libera rápidamente sin degradarse hacia el tejido cerebral. (Banks, et al., 1997; King y Johnson., 1985; Schuit., et al, 2001).

Efectos de la insulina en el sistema nervioso central

Los receptores de insulina se expresan en todos los tipos de células del cerebro, aunque existe una variación sustancial en los niveles de expresión entre las regiones. Dentro del cerebro, la densidad del receptor de insulina es más alta en el bulbo olfatorio, el hipotálamo, el hipocampo, la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el cerebelo. La amplia distribución de estos receptores sugiere que la señalización de la insulina tiene funciones importantes y diversas en el cerebro (Arnold, et al., 2018).

Los efectos mejor estudiados de la señalización de la insulina en el cerebro son los relacionados con la ingesta de alimentos y el gasto energético. Ya en 1979, Woods et al., demostraron que la infusión intracerebroventricular de insulina en babuinos podría disminuir notablemente la ingesta de alimentos y el aumento de peso corporal. Se ha demostrado que la administración de insulina en el tercer ventrículo

en roedores disminuye la ingesta de alimentos al disminuir la expresión de los neuropéptidos orexigénicos como neuropéptido Y (NPY) y péptido relacionado con Agouti (AgRP), y al aumentar la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado de cocaína y anfetamina (CART) en el núcleo arqueado (Kleinridders, et al., 2014).

La insulina también regula la transmisión de los receptores de N-metil- d- aspartato (NMDA) en las neuronas del hipocampo a través de la fosforilación de tirosina de subunidades específicas de los receptores NMDA NR2A y NR2B (Christie y Monaghan, 1999), y parece desencadenar el reclutamiento en la membrana de los receptores NMDA hacia los receptores excitadores. (Skeberdis, et al., 2001). Como resultado, la mejora de la actividad del receptor de NMDA en la terminal postsináptica contribuye al desarrollo de una potenciación a largo plazo en el hipocampo (van der Heide, et al., 2005), un paso importante en el aprendizaje y la memoria.

También se ha demostrado que la insulina regula los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) en el hipocampo y el cerebelo, desencadenando la endocitosis dependiente de clatrina de los receptores AMPA (Wang y Linden, 2000; Huang, et al., 2004). En las neuronas CA1 del hipocampo, esta regulación a la baja de la actividad del receptor AMPA en las terminales sinápticas excitadoras juega un papel en la depresión a largo plazo inducida por insulina, que generalmente se considera esencial tanto para la consolidación de la memoria como para la flexibilidad de la memoria (Ge, et al., 2010).

Se ha demostrado que los IR regulan la actividad del receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA) a través del reclutamiento de la membrana y la síntesis de proteínas en las neuronas del hipocampo, regulando así la actividad de las sinapsis inhibitorias (Wan, et al., 1997). Además, la insulina puede regular la plasticidad estructural en el cerebro, incluido el número de sinapsis, la plasticidad dendrítica y la función del circuito visual (Chiu, et al., 2008).

Esta hiperglicemia e hiperinsulinemia provocada por la obesidad puede ocasionar que el cerebro reciba grandes cantidades de insulina y glucosa, pues ambas

moléculas pueden ser transportadas e internalizadas en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica se libera rápidamente sin degradarse hacia el tejido cerebral. (Banks, et al., 1997; King y Johnson., 1985; Schuit., et al, 2001).

El aumento de la glucosa en cerebro podría ocasionar una mayor tasa de oxidación de la glucosa en las neuronas provocando la producción de las especies reactivas de oxígeno que activan a MAPKS que ocasionan la RI por la fosforilación en residuos de serina del IR (Schuit., et al, 2001; Giacco y Brownlee, 2010; Jalmi y Sinha, 2015). También, la hiperinsulinemia persistente acelera la endocitosis del IR, disminuyendo así el nivel de IR funcional en la membrana plasmática, lo que genera insensibilidad a la insulina, favoreciendo el desarrollo de resistencia a la insulina cerebral (Hall, et al., 2020). A pesar de que existen reportes donde se relaciona de manera directa la condición de obesidad con la resistencia a la insulina en diversos tejidos, se ha estudiado poco la aparición y/o establecimiento de la RIC y la relación temporal que podría tener con la RIP como la causalidad de esta aparición. Se ha reportado que una inyección intracerebroventricular de insulina en el POA provoca hipertermia en ratones (Sanchez, et al., 2009). Esta modulación de la insulina en las neuronas de la POA podría ayudar a evaluar la existencia de RIC y los mecanismos subyacentes en un modelo in vivo de obesidad.

IV. Material y métodos

Animales de experimentación

Todos los procedimientos se realizaron en ratones macho C57BL/6J (20-25 g de peso y 3 meses de edad), y su uso fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Guerrero. Para la inducción de la obesidad, los ratones se dividieron en 3 grupos (n= 3-7) alimentados con diferentes dietas: 1).- Grupo control (C), alimentado con dieta estándar (LabDiet, Num. Cat. 5001, St. Louis, MO, USA) que contiene 29% kcal de proteínas, 13% kcal de grasas, 58% kcal de carbohidratos y 2.89 kcal/g de densidad energética; 2).- Grupo alimentado con dieta alta en grasa (HFD), (Research Diets, Inc., Num. Cat. D12492, New Brunswick, NJ, USA) la dieta contiene 20% kcal de proteína, 60% kcal de grasas, 20% kcal de carbohidratos y 5.21 kcal/g de densidad energética; 3).- Grupo alimentado con dieta baja en grasas (LFD) (Research Diets, Inc., Num. Cat. D12450J, New Brunswick, NJ, USA) que contiene 20% kcal de proteína, 10% kcal de grasas, 70% kcal de carbohidratos, 3.82 kcal/g de densidad energética. Este último grupo fue incluido como dieta control ya que contiene una gran cantidad de grasas. Los grupos de animales fueron alimentados con las diferentes dietas durante 1, 2 o 3 meses y colocados en condiciones libres de patógenos, con acceso libre de agua y ciclo regular 12:12 luz-oscuridad (8 am luz prendida.) a una temperatura ambiental de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Protocolos experimentales

- Los ratones de 3 meses de edad se dividieron en 3 grupos de estudio: grupo alimentados con dieta control (C), grupo alimentado con dieta bajo en grasas (LFD) y grupo alimentado con dieta alta en grasas (HFD).
- Estos grupos experimentales se mantuvieron durante 3 lapsos de tiempo: 1 mes, 2 meses y 3 meses.

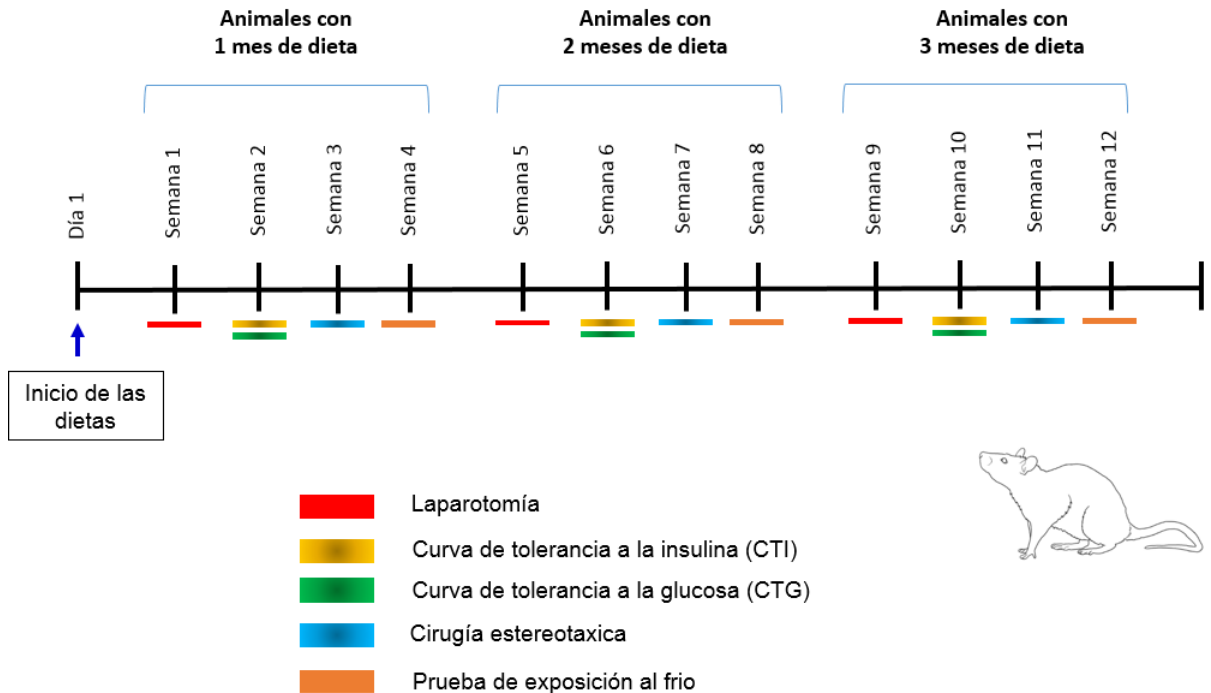


Figura 1. Esquema experimental de la inducción de obesidad y medición de la resistencia a la insulina periférica y cerebral en ratones C57BL / 6J. Se expusieron a los ratones a dietas C, LFD y HFD durante 1, 2 y 3 meses. El peso corporal se midió semanalmente durante 12 semanas; se realizaron laparotomías a la semana 1 (grupo de 1 mes con dieta), 5 (grupo de 2 meses con dieta) y 9 (grupo de 3 meses con dieta). Posteriormente, la curva de tolerancia a la insulina (CTI) y la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) se realizaron en las semanas 2, 6 y 10. La colocación de la cánula guía para las inyecciones de insulina en los ratones, se realizó mediante una cirugía estereotaxica en las semanas 3,7 y 11. Y para finalizar los experimentos se expusieron al frío a los ratones en las semanas 4,8 y 12.

Índice de masa corporal

Los animales se pesaron semanalmente. Los animales alimentados con HFD presentaban una diferencia de 40% más del peso corporal en comparación con el peso del grupo LFD y C.

Resistencia la insulina periférica

Para determinar el establecimiento de la RIC en nuestros grupos experimentales, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) a las 2, 6 y 10 semanas, para conocer los niveles de glucosa sanguínea, y curvas de tolerancia a la insulina (CTI) para observar si los animales son sensibles a la acción de la hormona al disminuir sus niveles de glucosa en sangre.

Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

Se tomó muestra sanguínea, por incisión en la cola del ratón con un ayuno previo de 8h a partir de las 8 de la mañana. Se realizó una primera medición de glucosa sanguínea, utilizando tiras reactivas y glucómetro OneTouch® Ultra 2 (LifeScan, Inc., PA, USA). Se administró por vía oral 2 g de glucosa por kg/peso corporal (SIGMA-Aldrich, San Luis., MO, USA). Posterior a la administración de glucosa se realizaron las mediciones de glucosa sanguínea a los 0, 30, 60, 90 y 120 min.

Curva de tolerancia a la insulina (CTI)

Se administró 0.5 UI de insulina recombinante humana por kg/peso corporal (Eli Lilly, Humulin R, D.F., México) vía intraperitoneal y se determinaron las concentraciones de glucosa a los 0, 30, 60, 90 y 120 min.

Resistencia a la insulina cerebral

Para determinar la RIC se realizaron estudios de telemetría para registrar los cambios de la temperatura corporal tras la estimulación de las inyecciones de insulina en el POA.

Implante peritoneal de datalogger

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital (PiSA Agropecuaria, Tula Atitalaquia, Hgo, Mex.) Se realizaron laparotomías a las 2, 6 y 10 semanas, para implantar los dispositivos SubCue Mini dataloggers (Canadian Analytical Technologies, Inc., Alberta, Canada) en la cavidad peritoneal, estos dispositivos registran la temperatura corporal central, tienen un peso de 2.5g y un diámetro de 1.6 cm x 0.6 cm de grosor con una sensibilidad de 0.01°C y una vida media de 2 a 3 años. Se programaron, mediante un cable conector utilizando el software SubCue Analyzer, para realizar mediciones de la temperatura corporal central cada 10 min por 15 días, la cual es detectada por la relación resistencia-temperatura del platino contenido en el interior del dispositivo y al aumentar la temperatura la interacción es mayor. Posterior a la cirugía peritoneal, los ratones se mantuvieron durante 2 semanas en

cajas individuales de plexiglás en una habitación mantenida a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 h con acceso libre a comida y agua.

Cirugía estereotaxica

Para las inyecciones cerebrales de insulina, los ratones se anestesiaron con pentobarbital y fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la colocación de una cánula guía (26 Ga, 10 mm de longitud) como lo utilizaron Sanchez-Alavez et al., 2010. Los animales fueron puestos en un estereotaxico Modelo 902 Dual Small Animal Stereotaxic Instrument. (David Kopf instruments, Tujunga, CA. USA). El cráneo fue inmovilizado utilizando lápices metálicos. Posterior a esto, con un bisturí se abrió la piel que recubre el cráneo, el músculo y la fascia superficial se desplazaron hacia un lado para exponer el hueso. Se realiza una perforación en el hueso parietal para la colocación de un tornillo de acero inoxidable y otro sobre la región de interés, para liberar la presión, siguiendo el manual de Paxinos y Watson. Las coordenadas para el POA fueron: anterior-posterior de bregma, +0.34 mm; lateral, en bregma; y ventral, 4.4 mm; para la colocación de la cánula por encima de la comisura anterior: anterior-posterior de bregma, +0.34 mm; lateral, en bregma; y ventral, 3,4 mm. Una vez perforado en la región de interés, se integra la cánula guía lentamente 5.1 mm hasta el POA y se asegura con cemento dental al tornillo. Se insertó una cánula simulada o un estilete (31 ga, 10 mm de longitud) en la cánula guía para mantener la permeabilidad y reducir el riesgo de infección. Los ratones se alojaron individualmente en una jaula de plexiglás en una habitación mantenida a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 8:00 a.m.) con acceso a alimentos y agua.

Posterior a los 2 días de recuperación de la cirugía, se inyectó 3 concentraciones diferentes de insulina recombinante humana por tres días [0.015 (día 1) , 0.03 (día 3) y 0.06 (día 5) UI] y el vehículo (0.3 ul de fluido cerebroespinal artificial) directamente en la POA a través de la cánula guía usando un inyector (33 Ga, 10.5 mm de longitud) conectado a un tubo de plástico y una microjeringa en un volumen

de 5 μ l (Hamilton Company Reno, Nevada, USA) durante un período de 1 min para permitir la difusión de la hormona.

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de dos vías (peso corporal * tiempo, glucosa * tiempo, temperatura corporal * tiempo) seguido de comparaciones entre grupos utilizando prueba t de student para la comparación entre las medias de los grupos C vs LFD, C vs HFD, LFD vs HFD. Los resultados se representan gráficamente con medias +/- error estándar, utilizando Graph Pad prism v6. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Reactivos

Dieta alta en grasas (Research Diets, Inc., Num. Cat. D12492, New Brunswick, NJ, USA) 20% kcal de proteína, 60% kcal de grasas, 20% kcal de carbohidratos y 5.21 kcal/g de densidad energética. **Dieta baja en grasas** (Research Diets, Inc., Num. Cat. D12450J, New Brunswick, NJ, USA) 20% kcal de proteína, 10% kcal de grasas, 70% kcal de carbohidratos, 3.82 kcal/g de densidad energética. **Dieta estándar** (LabDiet, Num. Cat. 5001, St. Louis, MO, USA) 29% kcal de proteínas, 13% kcal de grasas, 58% kcal de carbohidratos y 2.89 kcal/g de densidad energética.

Insulina recombinante humana (Eli Lilly, Humulin R, D.F., México) fue administrada en una dosis de 0.5 UI por kg/peso. **Glucosa:** SIGMA-Aldrich, Num. Cat. G8270, San Luis., MO, USA), en una dosis de 2 g por kg/peso. **Pentobarbital:** (PiSA Agropecuaria, Num. Cat. Q-7833-215, Tula Atitalaquia, Hgo, Mex) en una dosis de 30 mg por kg/peso.

V. Resultados

El establecimiento de la obesidad en los ratones C57BL/6J es inducida por la dieta HFD.

Para determinar el establecimiento de la obesidad en los ratones alimentados con HFD, se pesaron semanalmente a los animales expuestos a la dieta por 1, 2 o 3 meses. Después de 1 mes de dieta, el aumento promedio del peso corporal en los animales con HFD (32 g) fue de 8 g en comparación con el grupo LFD (26 g) y de 12 g en comparación con el grupo C (24 g) (Fig. 2A). Después de 2 meses de HFD (38 g), el peso corporal aumentó 12 g más en comparación con el grupo LFD (26 g) y 14 g en comparación con el grupo C (24 g) (Fig. 2B). Finalmente, después de 3 meses de dieta (44 g), se observó aumento de 12 g del peso comparado con el grupo LFD (32 g) y 18 g en comparación del grupo C (26 g) (Fig. 2C), confirmando así el estado de obesidad.

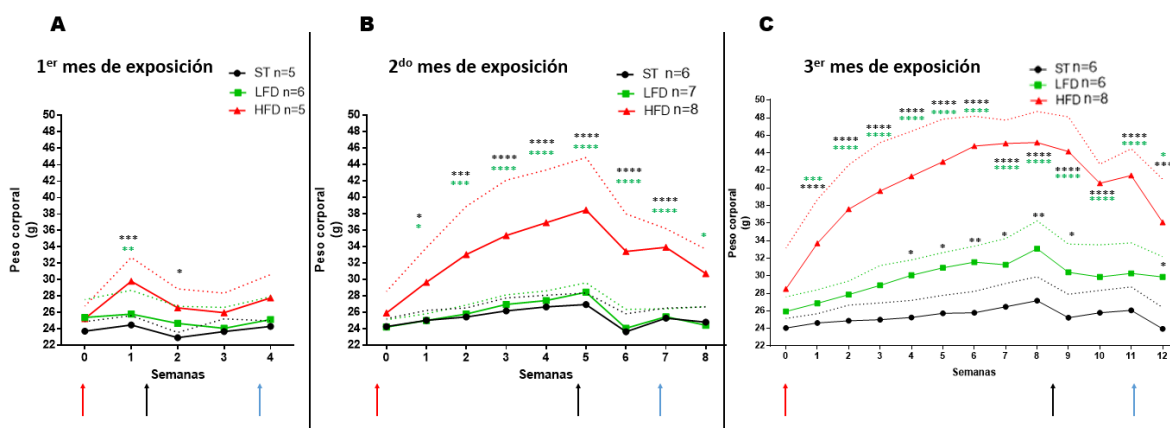


Figura 2. Efecto de la ingesta de grasa sobre el peso corporal de los ratones C57BL/6J. Se muestra el peso corporal de los ratones alimentados con diferentes dietas durante, 4 semanas (2A), 8 semanas (2B) y 12 semanas (2C). Los datos son mostrados como media +/- error estándar. C: Dieta estándar (línea negra), LFD: Dieta baja en grasas (línea verde), HFD: Dieta alta en grasas (línea roja). Los datos fueron comparados con ANOVA seguido de la prueba de t de student. **Flecha roja indica el inicio de la exposición a la dieta, flecha negra indica el tiempo de la realización de la laparotomía, flecha azul indica el tiempo de realización de cirugía estereotaxica.** El peso corporal de los animales con HFD aumentaron significativamente * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ en comparación con los ratones LFD, y **** $p < 0.0001$ en comparación con el grupo C en todas las semanas indicadas. El peso corporal de los animales con LFD aumentaron significativamente * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en todas las semanas indicadas en comparación con los ratones C.

La exposición crónica a la dieta HFD provoca intolerancia a la glucosa en ratones C57BL/6J.

Para determinar si los ratones desarrollaban intolerancia a la glucosa como un factor para el desarrollo de RIP, se determinó el nivel de glucosa sanguínea por 0, 30, 60, 90 y 120 min posterior a la administración de glucosa en los animales obesos por 1 mes (Fig. 3A), 2 meses (Fig. 3B) y 3 meses (Fig. 3C).

Durante los 3 meses (Fig. 3A, 3B, 3C), el nivel de glucosa en ayunas de los animales obesos fue mayor (200 mg/dl) en comparación con los ratones C y LFD (115 mg/dl). Minutos posteriores a la colocación de la glucosa, los niveles de los ratones obesos se elevaron hasta los 300 mg/dl de glucosa y disminuyeron al paso de los minutos pero manteniendo los 200 mg/dl de glucosa sanguínea, estableciendo una intolerancia a la glucosa en los ratones obesos.

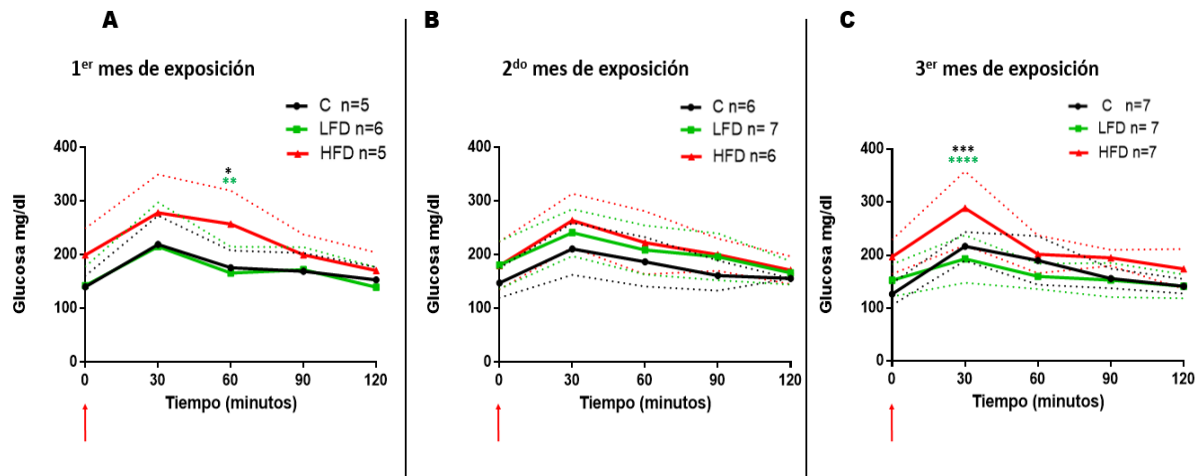


Figura 3. Efecto de la ingesta de HFD y LFD sobre la tolerancia a la glucosa en ratones C57BL/6J. Después de 2 (3A), 6 (3B) y 10 (3C) semanas alimentados con LFD, HFD y C, se administró por vía oral 2g de glucosa por kg de peso corporal. El nivel de glucosa se muestra en porcentaje en función del tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 min). Los datos son mostrados como media +/- error estándar. C: Dieta estándar, LFD: Dieta baja en grasas, HFD: Dieta alta en grasas. Los datos fueron comparados con ANOVA seguido de la prueba de t de student. **Flecha roja indica el tiempo de la administración de glucosa.** Las concentraciones de glucosa sanguínea en los ratones C aumentaron significativamente *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 de significancia, en comparación con los ratones LFD y HFD.

La resistencia a la insulina periférica se establece en ratones C57BL/6J alimentados con dieta HFD durante 3 meses.

Para determinar si los animales desarrollan insensibilidad a la insulina como un factor predisponente de RIP, se evaluó el nivel de glucosa sanguínea, posterior a la administración de insulina (0.5UI/kg), durante 2 horas con mediciones a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. Los animales obesos respondieron a la acción de la insulina durante primer y segundo mes al disminuir los niveles de glucosa después de la inyección de la insulina meses (Fig. 4A, 4B). Pero en el grupo obeso de 3 meses, los animales no mostraron disminución de glucosa posterior a la inyección de insulina al mantener de manera lineal, durante las 2 horas de la prueba, niveles de 180 mg/dl, confirmando así una insensibilidad a la insulina en el grupo obeso de 3 meses (Fig. 4C).

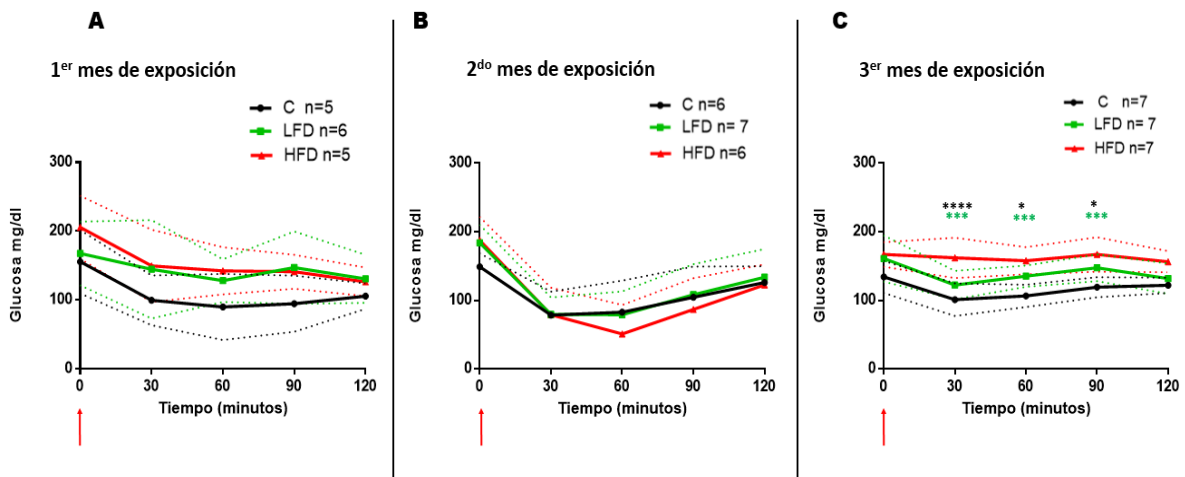


Figura 4. Efecto de la ingesta de grasa sobre la sensibilidad a la insulina periférica en ratones C57BL/6J. Después de 2 (4A), 6 (4B) y 10 (4C) semanas, alimentados con LFD, HFD y C, se administró por vía intraperitoneal 0.5 U de insulina por kg de peso corporal. El nivel de glucosa se muestra en porcentaje en función del tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 min). Los datos son mostrados como media +/- error estándar. C: Dieta estándar, LFD: Dieta baja en grasas, HFD: Dieta alta en grasas. Los datos fueron comparados con ANOVA se seguido de la prueba de t de student. **Flecha roja indica el tiempo de la administración de insulina.** Las concentraciones de glucosa sanguínea en los ratones HFD aumentaron *p<0.05, en comparación con los ratones C.

La exposición aguda a la dieta LFD promueve resistencia a la insulina cerebral que se revierte en un estado crónico de exposición.

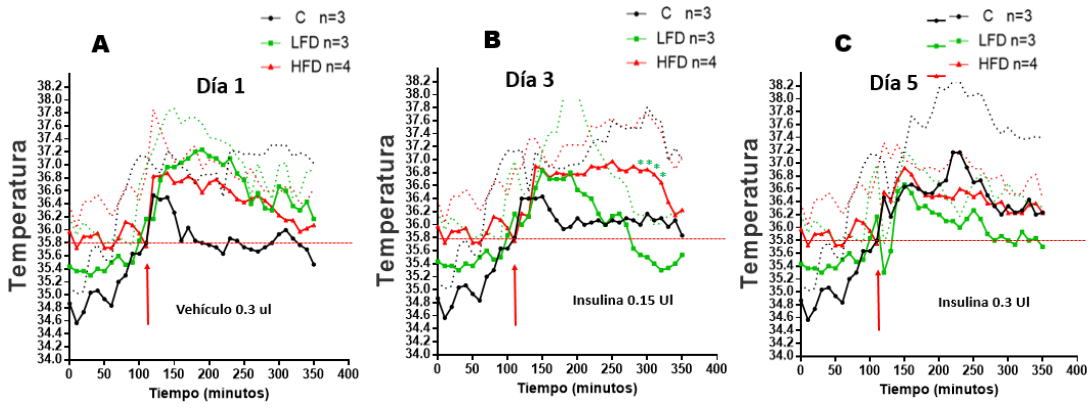
Para determinar presencia de RIC, se administró insulina (0.15, 0.3 y 0.6 UI) en el POA y se midió el cambio en la temperatura corporal durante 4 horas posteriores a la administración de insulina en los grupos experimentales.

En el primer mes, la inyección de insulina (0.15, 0.30, 0.60 UI) en el POA ocasionó una elevación de la temperatura corporal en el grupo C de 35.0 ± 0.5 °C a 36.7 ± 0.7 °C, también se observó un aumento de 35.0 ± 0.5 °C a 36.8 ± 0.4 °C en el grupo HFD al inyectar 0.3 y 0.6 UI de insulina (Fig. 5C, 5D). La temperatura corporal de los ratones alimentados con LFD se mantuvo en 35.0 ± 1.0 °C posterior a las 3 dosis de insulina inyectadas, lo cual indica una posible resistencia a la insulina cerebral (Fig. 5B, 5C, 5D). La temperatura media después de la inyección del vehículo fue 35.5 ± 1.00 °C para todos los grupos.

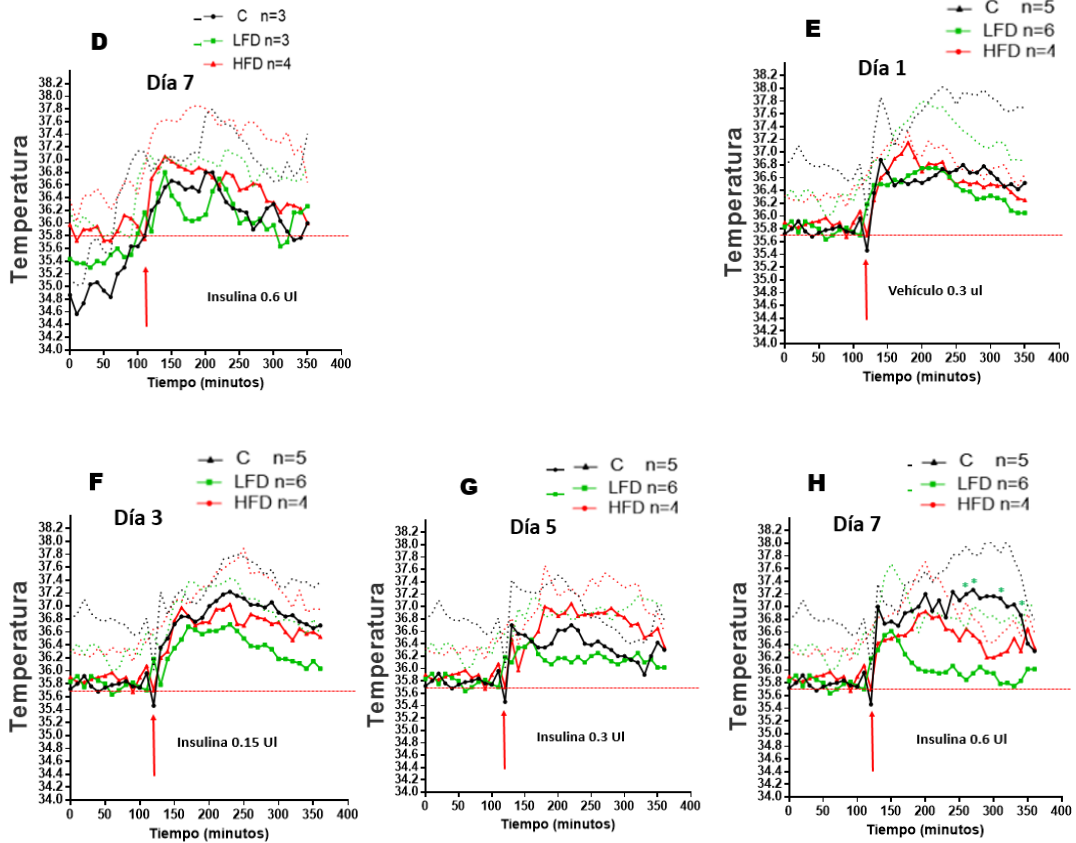
Los efectos hipertérmicos de la insulina no se observaron en los animales LFD, al mantener una temperatura de 35.5 ± 0.7 °C tras las dosis inyectadas de la hormona. Que, al comparar los valores de la temperatura con los grupos C (36.7 ± 0.7 °C) y HFD (36.8 ± 0.4 °C), observamos que los ratones LFD presentan resistencia a la insulina cerebral.

En el grupo LFD de tres meses de exposición, los efectos hipertérmicos de la insulina en todas las dosis inyectadas ocasionaron un aumento de la temperatura corporal, al observar temperaturas de 36.4 ± 0.7 °C mismos valores para los grupos C (36.4 ± 0.6) y HFD (36.4 ± 0.5 °C). Con esto podemos deducir que la resistencia observada en los grupos LFD del primer y segundo mes de exposición a la dieta fue revertida.

1^{er} mes de exposición



2^{do} mes de exposición



3^{er} mes de exposición

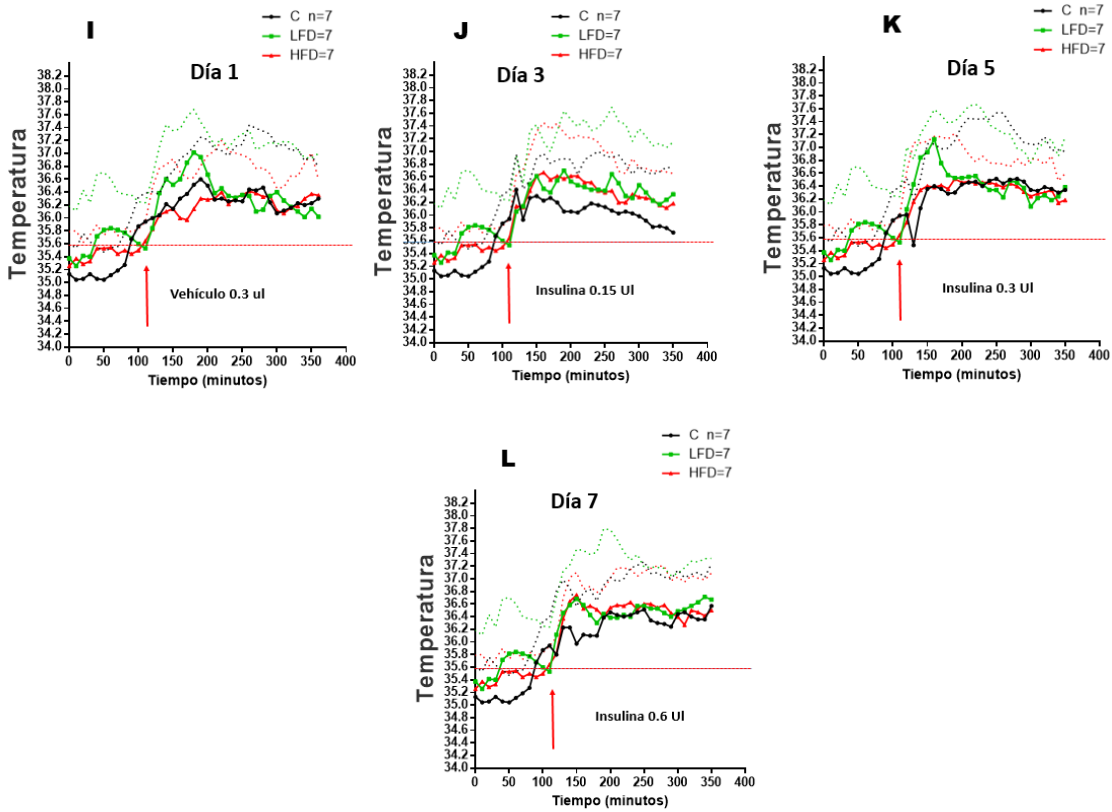


Figura 5. Efecto de las inyecciones cerebrales de insulina sobre la temperatura corporal central en ratones C57BL/6J. Se muestran los cambios de la temperatura corporal central (visceral) durante 4 horas, después de una inyección local de insulina en diferentes concentraciones en la POA (0,15, 0,3 y 0,6 UI) en grupos con 4 (5A-D), 8 (5E-H) y 12 (5I-L) semanas de exposición a las dietas. Los datos son mostrados como media +/- error estándar. C: Dieta estándar, LFD: Dieta baja en grasas, HFD: Dieta alta en grasas. Los datos fueron comparados con ANOVA se seguido de la prueba de t de student. **Flecha indica el tiempo de inyección de insulina, línea puntiaguda muestra el valor de la temperatura corporal estándar de los ratones.** El aumento de la TCC observado en todas las condiciones durante la primera hora se debe al estrés asociado con la inyección. La temperatura corporal de los ratones C aumento * $p < 0.05$ en comparación con los ratones LFD; los ratones HFD aumentaron * $p < 0.05$ en comparación de los ratones LFD.

La exposición al frío provoca hipotermia en ratones alimentados con dietas baja en grasas.

Para determinar si la exposición al frío podía inducir hipertermia, los ratones se expusieron a 10°C durante 12 hrs. Los grupos C y LFD mostraron dificultad para el mantenimiento de su temperatura corporal pasando por momentos de hipotermia (35.5 ± 1.0 °C) durante los 3 meses de exposición a la dieta; los animales alimentados con HFD regularon su temperatura manteniendo valores de 35.7 ± 0.50 °C en comparación con los LFD y C.

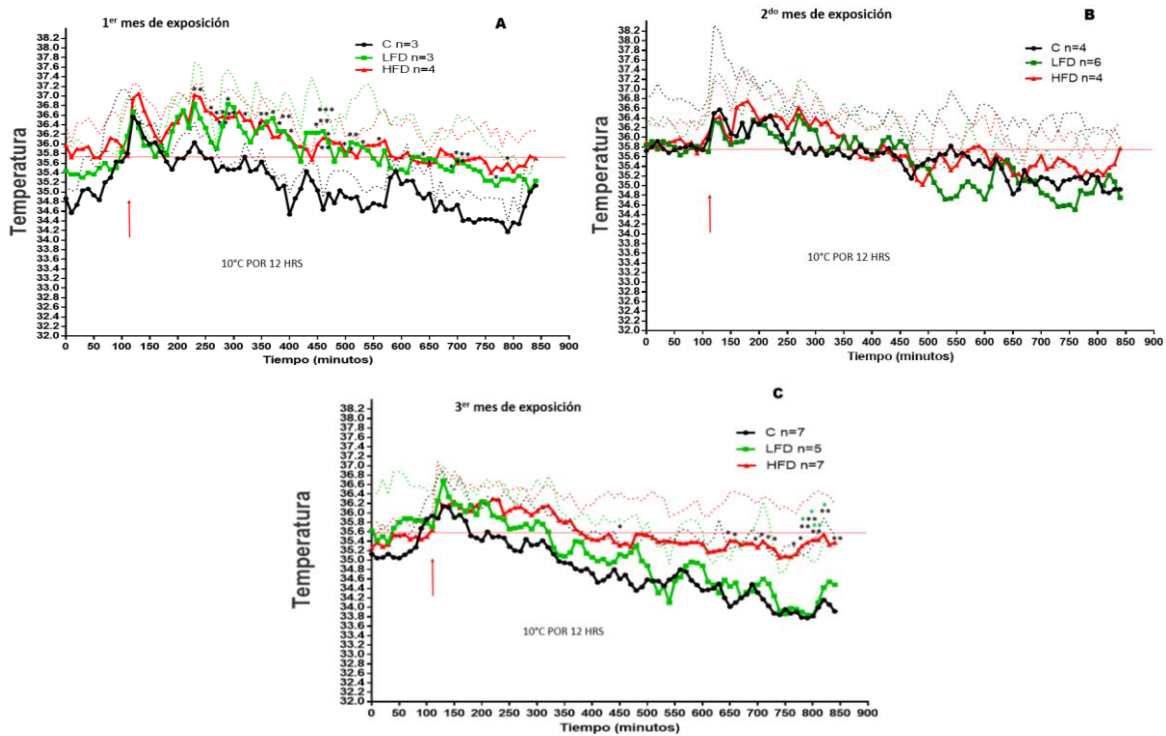


Figura 6. Efecto de la temperatura ambiental sobre la temperatura corporal central en ratones C57BL/6J. Se muestran los efectos sobre la temperatura corporal central después de la exposición al frío (10 °C/12 hrs) en grupos con 4 (**6A**), 8 (**6B**) y 12 (**6C**) semanas de dietas. Los datos son mostrados como media +/- error estándar. C: Dieta estándar, LFD: Dieta baja en grasas, HFD: Dieta alta en grasas. Los datos fueron comparados con ANOVA se seguido de la prueba de t de student. **Flecha indica el inicio de la exposición al frío, línea puntiaguda muestra el valor de la temperatura corporal estándar de los ratones.** La temperatura corporal de los ratones HFD y LFD aumento * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación con los ratones C; los ratones HFD aumentaron * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en comparación de los ratones LFD y C.

VI. Discusión

En el presente estudio se determinó el desarrollo de la resistencia a la insulina periférica y la resistencia a la insulina cerebral en ratones C57BL/6J, alimentados con 1) dieta alta en grasas, 2) dieta baja en grasas y 3) dieta estándar.

La CTG fue usada como indicador del desarrollo a la intolerancia a la glucosa. Los animales obesos (alimentados con HFD, durante uno, dos o tres meses) presentaron valores de glucosa en ayunas por arriba de los $200 + 0.5$ mg/dL (Fig. 3A, 3B y 3C) en comparación de los valores observados en los animales LFD ($140 + 0.5$ mg/dL) y C ($120 + 0.5$ mg/dL). La administración de glucosa (2 g/kg de peso) en los ratones obesos expuestos a dieta HFD por 3 meses, incremento los niveles de glucosa sanguínea cercano a $350 + 0.5$ mg/dL; El tiempo en que los niveles de glicemia disminuye esta prolongado, lo que indica que la regulación homeostática de la glucosa esta alterada. Debido a esto realizamos la prueba de sensibilidad a la insulina, y observamos que al tercer mes exposición a HFD el nivel de glucosa sanguínea en los animales de este grupo no disminuyó como se observó en los grupos C y LFD tras una inyección de insulina intraperitoneal (dosis), confirmando así una resistencia a la insulina periférica.

Se ha reportado que durante la obesidad, el hígado es el primer órgano que se daña como consecuencia de la gran cantidad de ácidos grasos (Polyzos, et al., 2017), los cuales se almacenan en los hepatocitos provocando un estado de estrés oxidativo y una deficiencia hepática (Milić, et al., 2014). Esta deficiencia ocasiona que la glucosa no se almacene en forma de glucógeno en el hígado y por lo tanto se observen niveles elevados de glucosa sanguínea en el grupo de animales alimentados con HFD.

Se ha reportado que durante la obesidad existe una hiperinsulinemia, la cual provoca una desensibilización de los receptores de insulina en las células debido a la fosforilación residuos de serina del IRS que atenúa su fosforilación en residuos de tirosina, inhabilitando la vía de señalización y ocasionando que no se transloque GLUT- 4 a la membrana, el cual es el principal transportador de la glucosa en musculo, hígado y tejido adiposo y por ende no se internaliza glucosa a la célula.

(Chen, et al., 2017). También se ha reportado que durante la obesidad (provocada por una HFD), se presentan niveles plasmáticos elevados de ácidos grasos libres porque el tejido adiposo (agrandado y estresado), libera más ácidos grasos libres, lo que dificulta la depuración eficiente de éstos, los cuales, una vez elevados, inhibirán la acción antilipofílica de la insulina, lo que aumentará aún más la liberación de ácidos grasos libres a la circulación (Boden, 2011).

Asimismo, se ha reportado que la concentración plasmática de ácidos grasos libres da como resultado una acumulación intramiocelular e intrahepática de triglicéridos, así como el Acil-CoA de cadena larga y el diacilglicerol (DAG), este último es un potente activador de la proteína quinasa C (PKC) la cual fosforila en residuos de serina/treonina. En el músculo esquelético humano, se ha demostrado que la elevación de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres aumenta el DAG y activa la PKC (Itani, et al., 2002). También se ha demostrado que la activación de PKC, causa resistencia a la insulina al fosforilar en residuos de serina al IRS (Yu, et al., 2002). El IRS posee más de 20 sitios consenso de serina / treonina por lo que se sugiere que otras cinasas serina / treonina están implicadas en la inhibición inducida por obesidad / ácidos grasos libres de la señalización y acción de la insulina al evitar la fosforilación del IR en residuos de tirosina (Boden, 2011).

Se ha descrito que microinyecciones de insulina en el área preóptica del hipotálamo en ratones induce aumento de la temperatura corporal dependiente de la dosis, determinando que una dosis de 0.3 ul de insulina induce hipertermia sostenida por 5 horas (Sanchez-Alavez et al., 2010). La insulina en el POA ocasiona que neuronas del núcleo dorsomedial señalicen a neuronas del rafe pálido, el cual estimula al sistema nervioso simpático para la liberación de noradrenalina de neuronas posganglionares, la cual actúa sobre el tejido adiposo marrón y desencadena que la proteína UCP1 se active para liberar energía térmica aprovechando el gradiente de protones en la membrana Inter mitocondrial y aumento de la temperatura corporal central (Biessels et al., 2013; Morrison, et al., 2014; Yahiro et al., 2017).

El propósito de este proyecto es evaluar si la inducción térmica de las microinyecciones de insulina en el área preóptica puede ser usada como medida del

desarrollo resistencia a la insulina central en animales alimentados con HFD por 3 meses.

Los ratones alimentados con LFD por 1 y 2 meses, no presentaron hipertermia provocada por el estímulo de la insulina, lo que evidencia el establecimiento de RIC. Esto se debe a que la LFD está constituida por un porcentaje elevado de carbohidratos (70%) en comparación con las dietas HFD (20%) y C (58%). Los carbohidratos promueven la secreción de insulina por parte de las células B del páncreas provocando una hiperinsulinemia (que no fue evaluada en este proyecto), la cual ocasiona que grandes cantidades de insulina sean transportadas al cerebro ocasionando desensibilización de los receptores de insulina (Komatsu, Takei, Ishii & Sato, 2013; Luo, Li & Yan, 2015). Por otra parte, los órganos periféricos y el cerebro utilizan diferentes transportadores (GLUT) para la internalización de la glucosa a la célula. En las neuronas del POA se expresa GLUT-3, mientras que en los astrocitos se expresa mayoritariamente GLUT-1, transportador que no necesitan del estímulo de la insulina para permitir el paso de la glucosa hacia el interior celular, provocando que haya mayor concentración intracelular de glucosa en estas células y aumento en la glucólisis, provocando la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROs) durante la respiración mitocondrial (que tampoco fue evaluada en este proyecto), que desencadena estrés oxidativo y por otra parte la liberación de citocinas proinflamatorias que afectarán a la sensibilidad a la insulina, provocando una RIC (Chen y Zhong., 2013).

Sin embargo, cuando los ratones fueron alimentados con LFD por tres meses se observó que los ratones nuevamente respondían al estímulo de la insulina en el POA, al detectar hipertermia sostenida en estos ratones, es decir, se reestableció el estímulo de la insulina en la zona cerebral después de que en los primeros dos meses se detectó RIC.

Esto puede deberse a un estado de preacondicionamiento neuronal, que favorece el restablecimiento de las funciones neuronales, en este caso, la sensibilidad del IR y con ello sus múltiples funciones en el cerebro. Se comentó que una elevada cantidad de glucosa en las neuronas provocaba un estado de estrés oxidativo como

consecuencia de la oxidación de la glucosa, pero se ha descrito que un estado de estrés oxidativo favorece el precondicionamiento neuronal. Zeiger, et al., 2010 describieron que cuando bloqueaban la producción de radicales libres en las células, disminuía significativamente el efecto neuroprotector del precondicionamiento neuronal y con ello aumentaba la muerte celular.

Además, los ratones alimentados con LFD, durante los 3 meses, no desarrollaron obesidad que ocasiona hipertrofia en el tejido adiposo blanco, provocando un aumento de secreción de leptina, pues, se ha descrito que un aumento de leptina ocasiona desensibilización del receptor de leptina (resistencia a la leptina) que llega a ser perjudicial para la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos; ya que la leptina favorece la sensibilidad a la insulina activando la vía de PI3K/AKT que evita la activación de la vía de las MAPK y con esto disminuir los niveles de JNK, ERK $\frac{1}{2}$ que provocan la fosforilación del IR en residuos de serina y así revertir el estado de RIC (Morton, et al., 2005).

En este grupo de animales con LFD no existió un establecimiento de la RIP ya que no observamos niveles de glucosa sanguínea elevados en las curvas de tolerancia, esto puede ser explicado debido a que órganos periféricos y el cerebro utilizan diferentes transportadores (GLUT) para la internalización de la glucosa a la célula. Los órganos periféricos (hígado, músculo, tejido adiposo) utilizan GLUT-4 el cual se encuentra contenido en vesículas dentro de la célula y necesita el estímulo de la insulina para poder translocarse a la membrana y permitir el paso de la glucosa hacia el interior celular (Bryant, Govers & James, 2002), esta acción dependiente de la presencia de GLUT4 en la membrana, podría evitar el establecimiento de RIP, hasta que se saturen los receptores por la constante presencia de la insulina, derivada de la ingesta de dieta alta en carbohidratos, que estarán activando a las células B del páncreas para que libere constantemente insulina. Sin embargo, posterior a tres meses de dieta, no observamos RIP, aunque no descartamos la posibilidad de que pueda presentarse en tiempos posteriores.

El establecimiento de la RIC en los animales LFD y HFD provocó que el proceso de termogénesis no se lleve a cabo de una manera correcta tras la estimulación de la

insulina en el POA, evidenciando el daño a nivel cerebral. Por lo anterior, los ratones se expusieron al frío para ver si de esta manera se inducía la termogénesis independiente del estímulo de la insulina.

Vijgen, et al (2011) reportaron que el frío moderado (10°C) puede estimular la termogénesis adaptativa en individuos delgados y obesos, debido a que inducen la activación de las neuronas sensibles al frío en el POA, éstas, en colaboración con las neuronas sensibles al calor, activan la vía termorreguladora de retroalimentación al responder directamente a los cambios en la temperatura intracraneal (Madden y Morrison, 2019). La cual consiste en la producción de calor por parte del tejido adiposo marrón a través de la proteína desacoplante 1 (UCP 1) al metabolizar los ácidos grasos contenidos en el interior de los adipocitos, (van Marken, et al., 2009).

Se esperaba que en los ratones alimentados con HFD presentarían hipotermia por una nula activación de la termogénesis debido al bajo porcentaje de tejido adiposo marrón y a la elevada concentración del tejido adiposo blanco (van Marken, et al., 2009), pero no fue así; los ratones con HFD tuvieron una mejor respuesta termogénica en la exposición al frío, ya que se ha reportado que el frío ayuda a la diferenciación del tejido adiposo blanco a marrón y favorece la degradación de los ácidos grasos para la producción de calor. En lo que respecta al grupo C, los animales presentaron más momentos de hipotermia lo cual puede ser discutido porque el frío ocasionó un gasto mayor de las grasas contenidas en el tejido adiposo marrón dentro de las primeras horas de exposición, generando incapacidad para regular su temperatura corporal al final del experimento.

VII. Conclusión

- La dieta HFD provocó un estado de obesidad que se vio reflejado en una ganancia de más del 50% del peso corporal comparado con el grupo control.
- Un consumo de una dieta alta en grasas por 3 meses induce resistencia a la insulina periférica en ratones C57BL/6J.
- La dieta baja en grasas, pero alta en carbohidratos induce resistencia a la insulina cerebral al primer y segundo mes de consumo en ratones C57BL/6J y no induce resistencia a la insulina periférica.
- La RIC en ratones con LFD es revertida al tercer mes de exposición

VIII. Bibliografía

1. **Aiston, S.**, Hampson, L. J., Arden, C., Iynedjian, P. B., & Agius, L. (2006). The role of protein kinase B/Akt in insulin-induced inactivation of phosphorylase in rat hepatocytes. *Diabetologia*, 49(1), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0068-4>
2. **Aguilar-Bryan, L.**, & Bryan, J. (1999). Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine reviews*, 20(2), 101–135.
3. **Arner, P.** and Rydén, M., 2015. Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance. *Obesity Facts*, 8(2), pp.147-155.
4. **Ashcroft, F. M.**, Proks, P., Smith, P. A., Ammälä, C., Bokvist, K., & Rorsman, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Journal of cellular biochemistry*, 55 Suppl, 54–65.
5. **Asor E**, Stempler S, Avital A, Klein E, Ruppin E, Ben-Shachar D. (2015). The role of branched chain amino acid and tryptophan metabolism in rat's behavioral diversity: Intertwined peripheral and brain effects. *European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 25(10):1695-1705.
6. **Banks WA**, Jaspan JB, Kastin AJ. (1997). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides*. 1997; 18(8):1257-1262.
7. **Belfiore, A.**, Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A. and Vigneri, R., 2017. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocrine Reviews*, 38(5), pp.379-431.
8. **Biddinger, S. B.**, & Kahn, C. R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annual review of physiology*, 68, 123–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124723>
9. **Biessels, G. J.**, Strachan, M. W., Visseren, F. L., Kappelle, L. J., & Whitmer, R. A. (2014). Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2(3), 246-255.
10. **Boden, G.**, 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 18(2), pp.139-143.
11. **Bryant, NJ**, Govers, R. & James, DE (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3, 267-277.
12. **Chen W**, Balland E, Cowley MA. (2017). Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. *Neuroendocrinology*, 104(4):364-381.

13. **Chen Z**, Zhong C. (2013). Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*, 108, 21-43.
14. **Cherrington, A. D.**, Edgerton, D., & Sindelar, D. K. (1998). The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*, 41(9), 987–996. <https://doi.org/10.1007/s001250051021>
15. **Chiu, S. L.**, Chen, C. M., & Cline, H. T. (2008). Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron*, 58(5), 708–719. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>
16. **Christie, J. M.**, Wenthold, R. J., & Monaghan, D. T. (1999). Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 72(4), 1523–1528.
17. **Detimary, P.**, Dejonghe, S., Ling, Z., Pipeleers, D., Schuit, F., & Henquin, J. C. (1998). The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in beta cells but not in alpha cells and are also observed in human islets. *The Journal of biological chemistry*, 273(51), 33905–33908.
18. **Felig, P.**, Marliss, E., & Cahill, G. F., Jr (1969). Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *The New England journal of medicine*, 281(15), 811–816. <https://doi.org/10.1056/NEJM196910092811503>
19. **Fernández-Sánchez, A.**, Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C. and Morales-González, J., 2011. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), pp.3117-3132.
20. **Franke, T.**, Hornik, C., Segev, L., Shostak, G. and Sugimoto, C., 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22(56), pp.8983-8998.
21. **Ge, Y.**, Dong, Z., Bagot, R. C., Howland, J. G., Phillips, A. G., Wong, T. P., & Wang, Y. T. (2010). Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), 16697–16702.
22. **Giacco, F.**, & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
23. **Guilherme A**, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5):367-377.
24. **Haeusler, R.**, McGraw, T. and Accili, D., 2017. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), pp.31-44.
25. **Hall, C.**, Yu, H. and Choi, E., 2020. Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), pp.911-920.

26. **Huang, C. C.**, Lee, C. C., & Hsu, K. S. (2004). An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 89(1), 217–231.
27. Huang, M., & Joseph, J. W. (2012). Metabolomic analysis of pancreatic β -cell insulin release in response to glucose. *Islets*, 4(3), 210–222. <https://doi.org/10.4161/isl.20141>
28. **Hubbard, S.**, 2013. The Insulin Receptor: Both a Prototypical and Atypical Receptor Tyrosine Kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), pp.a008946-a008946.
29. **Itani, S.**, Ruderman, N., Schmieder, F. and Boden, G., 2002. Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol, Protein Kinase C, and I B-. *Diabetes*, 51(7), pp.2005-2011.
30. **Jung, SB**, Choi, MJ, Ryu, D., Yi, HS, Lee, SE, Chang, JY, Chung, HK, Kim, YK, Kang, SG, Lee, JH, Kim, KS, Kim, HJ, Kim , CS, Lee, CH, Williams, RW, Kim, H., Lee, HK, Auwerx, J. y Shong, M. (2018). La capacidad oxidativa reducida en los macrófagos da como resultado una resistencia sistémica a la insulina. *Nature communications*.
31. **Jalmi, S. K.**, & Sinha, A. K. (2015). ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in plant science*, 6, 769. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00769>
32. **Kahn, S. E.**, Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846. <https://doi.org/10.1038/nature05482>
33. **Kim, F.**, Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D., Tupper, J., Thaler, J., Hawn, T., Raines, E. and Schwartz, M., 2007. Toll-Like Receptor-4 Mediates Vascular Inflammation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity. *Circulation Research*, 100(11), pp.1589-1596.
34. **King GL**, Johnson SM. (1985). Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science*, 227(4694):1583-1586.
35. **Kojta, I.**, Chacińska, M. and Błachnio-Zabielska, A., 2020. Obesity, Bioactive Lipids, and Adipose Tissue Inflammation in Insulin Resistance. *Nutrients*, 12(5), p.1305.
36. **Komatsu M.**, Takei M., Ishii H., & Sato Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: a newer perspectiv. *Journal of Diabetes Investigation*, vol. 4, no. 6, pp. 511–516.
37. **Lagathu, C.**, Yvan-Charvet, L., Bastard, J., Maachi, M., Quignard-Boulangé, A., Capeau, J. and Caron, M., 2006. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*, 49(9), pp.2162-2173.
38. **Lauterbach, M.** and Wunderlich, F., 2017. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(3-4), pp.385-396.

39. **Lebovitz H. E.** (2001). Insulin resistance: definition and consequences. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 109 Suppl 2, S135–S148
40. **Lee, B.** and Lee, J., 2014. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), pp.446-462.
41. **Lotta, L.**, Gulati, P., Day, F., Payne, F., Ongen, H., van de Bunt, M., Gaulton, K., Eicher, J., Sharp, S., Luan, J., De Lucia Rolfe, E., Stewart, I., Wheeler, E., Willems, S., Adams, C., Yaghootkar, H., Forouhi, N., Khaw, K., Johnson, A., Semple, R., Frayling, T., Perry, J., Dermitzakis, E., McCarthy, M., Barroso, I., Wareham, N., Savage, D., Langenberg, C., O'Rahilly, S. and Scott, R., 2017. Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. *Nature Genetics*, 49(1), pp.17-26
42. **Luo, X.**, Li, R., & Yan, L. J. (2015). Roles of Pyruvate, NADH, and Mitochondrial Complex i in Redox Balance and Imbalance in β Cell Function and Dysfunction. *Journal of Diabetes Research*.
43. **Lynch, C. J.**, & Adams, S. H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(12), 723–736. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.171>
44. **Madden, C.** and Morrison, S., 2019. Central nervous system circuits that control body temperature. *Neuroscience Letters*, 696, pp.225-232.
45. **Milić S**, Lulić D, Štimac D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*, 20(28):9330-9337.
46. **Morton, G.**, Gelling, R., Niswender, K., Morrison, C., Rhodes, C. and Schwartz, M., 2005. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metabolism*, 2(6), pp.411-420.
47. **Osborn, O.**, & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*, 18(3), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nm.2627>
48. **Petersen, M. C.**, & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
49. **Polyzos SA**, Kountouras J, Mantzoros CS. (2017). Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol*, 42(2):92-108.
50. **Sanchez-Alavez, M.**, Tabarean, I. V., Osborn, O., Mitsukawa, K., Schaefer, J., Dubins, J., et al. (2009). Insulin causes hyperthermia by direct inhibition of warm-sensitive neurons. *Diabetes*, 59(1), 43-50.

51. **Saltiel, A.**, 2015. Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. *Metabolic Control*, pp.51-71.
52. **Schuit, F. C.**, Huypens, P., Heimberg, H., & Pipeleers, D. G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*, 50(1), 1–11. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.1.1>
53. **Skeberdis, V. A.**, Lan, J., Zheng, X., Zukin, R. S., & Bennett, M. V. (2001). Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3561–3566. <https://doi.org/10.1073/pnas.051634698>
54. **Van der Heide, L. P.**, Kamal, A., Artola, A., Gispen, W. H., & Ramakers, G. M. (2005). Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *Journal of neurochemistry*, 94(4), 1158–1166.
55. **Van Marken Lichtenbelt WD**, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009; 360(15):1500-1508.
56. **Vishvanath, L.** and Gupta, R., 2019. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), pp.4022-4031.
57. **Vijgen GH**, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. (2011). Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS One* 6 (2): e17247.
58. **Wan, Q.**, Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Branton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*, 388(6643), 686–690.
59. **Wang, Y. T.**, & Linden, D. J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron*, 25(3), 635–647.
60. **Woods, S. C.**, Lotter, E. C., McKay, L. D., & Porte, D., Jr (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, 282(5738), 503–505.
61. **Yahiro, T.**, Kataoka, N., Nakamura, Y., & Nakamura, K. (2017). The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Sci Rep*, 7(1), 5031.
62. **Yu, C.**, Chen, Y., Cline, G., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J., Cushman, S., Cooney, G., Atcheson, B., White, M., Kraegen, E. and Shulman, G., 2002. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), pp.50230-50236.

63. **Zeiger, S.**, McKenzie, J., Stankowski, J., Martin, J., Cliffel, D. and McLaughlin, B., 2010. Neuron specific metabolic adaptations following multi-day exposures to oxygen glucose deprivation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(11), pp.1095-1104.
64. **Zhenyukh, O.**, Civantos, E., Ruiz-Ortega, M., Sánchez, M. S., Vázquez, C., Peiró, C., Egido, J., & Mas, S. (2017). High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free radical biology & medicine*, 104, 165–177.