



Posgrado en
Biología Experimental



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO PROTECTOR DE NICOTINAMIDA SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y EL DÉFICIT COGNITIVO EN RATAS
ALIMENTADAS CON UNA DIETA HIPERCALÓRICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

MTRO. EN BIOL. EXP. ARMANDO RAMÍREZ CRUZ

MATRÍCULA: 2173801684

CORREO: armando_050688@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-9774-3569

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTOR EXTERNO: DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES

CODIRECTOR INTERNO: DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

ASESOR INTERNO: DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ

JURADO

PRESIDENTE:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

SECRETARIA:

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

VOCALES:

DRA. LETICA MANUEL APOLINAR

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Iztapalapa, Ciudad de México 23 de mayo de 2024

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONAHCYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo proporcionado por el CONAHCYT a través de la beca N° 638428.

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en colaboración con el laboratorio de Biomembranas y el laboratorio de Neuropsicobiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la Co-Dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores, el Dr. José Luis Gómez Olivares y la asesoría de la Dra. Beatriz Gómez González.

Agradezco profunda y sinceramente a todos por su paciencia, sus enseñanzas, dedicación y constante apoyo para el desarrollo y la realización de este trabajo.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“Efecto protector de nicotinamida sobre la integridad de la barrera hematoencefálica y el déficit cognitivo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica”**, que presentó.

Mtro. en Biol. Exp. Armando Ramírez Cruz

El día 23 de mayo del año 2024

Presidente Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Profesor Investigador Titular C, Farmacología y Química de la diabetes,
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa. Correo: jcap@xanum.uam.mx

Secretaria Dra. Rocio Salceda Sacanelles

Investigadora Titular "C" (TC.) Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología,
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Correo:
rsalceda@ifc.unam.mx

Vocal 1 Dra. Leticia Manuel Apolinar

Investigadora Titular A, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Endócrinas, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI. Correo:
letymanu@yahoo.com.mx

Vocal 2 Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Profesor Titular C, Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y
Función, FES Iztacala, UNAM. Correo: labaiza@unam.mx

COMITÉ TUTORAL

Codirector Externo

Dra. Margarita Díaz Flores
Investigadora Asociada D
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

Codirector Interno

Dr. José Luis Gómez Olivares
Profesor Titular C
Investigador del Laboratorio de Biomembranas
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora interna

Dra. Beatriz Gómez González
Profesora Titular C
Investigadora en el Área de Neurociencias,
Departamento de Biología de la Reproducción
CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Este trabajo lo dedico a mi esposa Soledad Saltillo

” Gracias por estar a mi lado. Para mí, lo más importante ha sido tu apoyo. Sé que no ha sido fácil y que has hecho muchos sacrificios para acompañarme. Por eso, te dedico este trabajo con todo mi amor, cariño y agradecimiento”.

Agradecimientos.

Quiero agradecer especialmente a mi esposa Soledad Saltillo, por su apoyo, su amor y toda su paciencia.

A mi comité de tutores: la doctora Margarita Díaz, el doctor José Luis Gómez y la doctora Beatriz Gómez, por todo su apoyo y consejos, pero, sobre todo, por sus enseñanzas y aceptar ser parte de este proceso académico.

Queridos amigos, colegas y familiares.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos ustedes por estar aquí hoy y por su inquebrantable apoyo. Este logro no hubiera sido posible sin la guía y el aliento de muchos de ustedes.

A mis colegas, gracias por su colaboración y por compartir su sabiduría y experiencia. A mis amigos, por su constante motivación y por recordarme la importancia del equilibrio entre el trabajo y la vida personal. A mi familia, por su amor incondicional y por ser mi pilar de fortaleza en todo momento.

Este momento es un reflejo del esfuerzo colectivo y la dedicación de todos ustedes. Gracias por ser parte de este viaje y por creer en mí. Estoy inmensamente agradecido.

Resumen

El estrés oxidante y la inflamación provocados por la ingesta de alimentos con un alto contenido calórico están vinculados con la disfunción de la barrera hematoencefálica (BBB), el deterioro cognitivo y el aumento en la actividad de las colinesterasas (ChEs), enzimas que hidrolizan al neurotransmisor acetilcolina (ACh), afectando la señalización colinérgica, incluyendo la vía colinérgica anti-inflamatoria. La nicotinamida (NAM), es una forma de vitamina B3 y precursora de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), es esencial en la transferencia de electrones a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción implicadas en el metabolismo celular. Además, NAD^+ es utilizado como cofactor en la expresión génica, la reparación del ADN y la restauración de los sistemas antioxidantes. Por sus propiedades, NAM podría mitigar las alteraciones que se producen debido a la ingesta de dietas hipercalóricas. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto de la NAM sobre el deterioro de la BBB y la función cognitiva, además de su efecto sobre la señalización colinérgica. Para ello, cuarenta ratas macho fueron distribuidas en cinco grupos: un grupo fue alimentado con una dieta estándar, otro grupo fue alimentado con una dieta alta en grasas, más agua de beber con sacarosa el 40 % (grupo HFS). Los 3 grupos restantes fueron alimentados con una dieta HFS y la bebida con sacarosa fue sustituida 5 horas por la mañana, durante 5 días a la semana por agua de beber que contenía NAM a 5, 10 y 15 Mm (grupos HFS-NAM5, HFS-NAM10 y HFS-NAM15). Todos los tratamientos fueron administrados durante

12 semanas a libre acceso. Posteriormente, en los grupos de estudio se evaluó el perfil bioquímico, los marcadores de estrés oxidante, inflamación, las actividades de las ChEs, la permeabilidad de la BBB administrando trazadores que no cruzan una barrera íntegra y la capacidad cognitiva mediante la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM). Los resultados mostraron que la dieta HFS alteró el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, provocando resistencia a la insulina. Simultáneamente, en suero aumentaron las actividades ChEs, los niveles de citocinas proinflamatorias, la oxidación de proteínas y la lipoperoxidación, junto con un decremento de la capacidad antioxidante. En el hipocampo se observó un aumento en la actividad de las ChEs, la lipoperoxidación y las proteínas carboniladas, junto con una disminución de la capacidad antioxidante. Los cambios sistémicos y del hipocampo se reflejaron en un aumento de la permeabilidad de la BBB y en un deterioro cognitivo. Por otra parte, la NAM atenuó las alteraciones ocasionadas por la dieta HFS reduciendo el estrés oxidante, la inflamación, la actividad de las ChEs y la permeabilidad de la BBB, mientras que mejoró la capacidad cognitiva.

NAM podría ser un potencial protector sistémico y del hipocampo para atenuar el daño cognitivo inducido por las dietas hipercalóricas.

PALABRAS CLAVE: Dieta hipercalórica, Colinesterasas, nicotinamida, barrera hematoencefálica, hipocampo, función cognitiva.

Abstract

Oxidative stress and inflammation caused by the intake of high-calorie foods are linked to blood-brain barrier (BBB) dysfunction, cognitive impairment, and increased activity of cholinesterases (ChEs), enzymes that hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine (ACh), affecting cholinergic signaling, including the anti-inflammatory cholinergic pathway. Nicotinamide (NAM), a form of vitamin B3 and precursor of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), is essential in electron transfer through a series of oxidation-reduction reactions involved in cellular metabolism. Additionally, NAD⁺ is used as a cofactor in gene expression, DNA repair, and the restoration of antioxidant systems. Due to its properties, NAM could mitigate the alterations caused by the intake of hypercaloric diets. The aim of this study was to evaluate the effect of NAM on BBB impairment and cognitive function, as well as its effect on cholinergic signaling. For this purpose, forty male rats were divided into five groups: one group was fed a standard diet, another group was fed a high-fat diet plus drinking water with 40% sucrose (HFS group). The remaining three groups were fed an HFS diet, and the sucrose drink was replaced for 5 hours in the morning, 5 days a week, with drinking water containing NAM at 5, 10, and 15 mM (HFS-NAM5, HFS-NAM10, and HFS-NAM15 groups). All treatments were administered for 12 weeks ad libitum. Subsequently, the biochemical profile, oxidative stress markers, inflammation, ChEs activities, BBB permeability by administering tracers that do not cross an intact barrier, and cognitive ability using the Morris Water Maze (MWM) test were evaluated in the study groups. The results showed that the HFS diet altered carbohydrate and

lipid metabolism, causing insulin resistance. Simultaneously, serum ChEs activities, pro-inflammatory cytokine levels, protein oxidation, and lipid peroxidation increased, along with a decrease in antioxidant capacity. In the hippocampus, increased ChEs activity, lipid peroxidation, and carbonylated proteins were observed, along with a decrease in antioxidant capacity. The systemic and hippocampal changes were reflected in increased BBB permeability and cognitive impairment. On the other hand, NAM attenuated the alterations caused by the HFS diet by reducing oxidative stress, inflammation, ChEs activity, and BBB permeability while improving cognitive ability. NAM could be a potential systemic and hippocampal protector to attenuate cognitive damage induced by hypercaloric diets.

KEYWORDS: Hypercaloric diet, Cholinesterases, Nicotinamide, Blood-brain barrier, Hippocampus, Cognitive function.

Índice

1. Introducción	-1-
1.1. <i>Malos hábitos en la alimentación y enfermedades metabólicas</i>	-1-
1.2. <i>Carbohidratos: principal fuente de la dieta moderna</i>	-2-
1.3. <i>Las grasas de la dieta: metabolismo y efectos</i>	-4-
1.4. <i>Las dietas hipercalóricas: la inflamación y el estrés oxidante</i>	-6-
1.5. <i>La dieta hipercalórica, permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y deterioro cognitivo</i>	-9-
1.6. <i>Propiedades de las colinesterasas (ChEs)</i>	-13-
1.7. <i>La vía colinérgica anti-inflamatoria y el papel de las ChEs</i>	-16-
1.8. <i>Los antioxidantes como una potencial alternativa terapéutica</i>	-19-
1.9. <i>Las vitaminas y su importancia en el metabolismo celular</i>	-19-
1.10. <i>La nicotinamida (NAM), una vitamina esencial para la protección antioxidante</i>	-20-
2. Antecedentes	-22-
3. Justificación	-29-
4. Pregunta de investigación	-29-
5. Hipótesis	-29-
6. Objetivo general	-30-
6.1. <i>Objetivos específicos</i>	-30-
7. Material y métodos	-30-
7.1. <i>El manejo ético de los animales</i>	-30-

7.2. Los animales y los tratamientos	-31-
7.3. Determinación de glucosa en ayuno	-32-
7.4. Ensayo de memoria y aprendizaje espacial	-32-
7.5 Las muestras biológicas.....	-34-
7.6. Análisis de los marcadores metabólicos	-34-
7.7. Determinación de las citocinas proinflamatorias y la insulina	-35-
7.8. Determinación de la lipoperoxidación en el suero y el hipocampo	-36-
7.9. Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH) en el suero y el hipocampo	-36-
7.10. Determinación de glutatión oxidado (GSSG) en el suero y el hipocampo.....	-37-
7.11. Determinación de las proteínas carboniladas en el suero y el hipocampo.....	-37-
7.12. Determinación de la capacidad antioxidante en el hipocampo y el suero.....	-38-
7.13. Ensayo de actividad específica de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE).....	-39-
7.14. Inhibición in vitro de la actividad de AChE por la NAM	-40-
7.15. Ensayo de permeabilidad de la BBB.....	-41-
7.16. Análisis estadístico.....	-42-
8. Resultados.....	-42-
8.1. La administración de la NAM reduce el tejido adiposo y aumenta	

<i>la masa muscular</i>	-42-
8.2. <i>La administración de la NAM mejora el perfil metabólico y las</i> <i>citocinas proinflamatorias</i>	-43-
8.3. <i>La administración de la NAM reduce en suero la lipoperoxidación,</i> <i>proteínas carboniladas y la actividad de las ChEs, aumentando la</i> <i>capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG</i>	-45-
8.4. <i>La administración de la NAM reduce la lipoperoxidación, proteínas</i> <i>carboniladas y la actividad de las ChEs, aumentando la capacidad</i> <i>antioxidante y la relación GSH/GSSG en el hipocampo</i>	-47-
8.5. <i>La administración de la NAM disminuye la permeabilidad de la BBB</i> <i>en el hipocampo</i>	-49-
8.6. <i>La administración de la NAM atenúa el deterioro cognitivo inducido por</i> <i>la sobrecarga calórica</i>	-50-
8.7. <i>La NAM es un inhibidor acompetitivo de la actividad de AChE</i>	-51-
9. Discusión	-52-
10. Conclusiones	-62-
11. Perspectivas	-63-
12. Referencias	-64-
13. Artículo publicado	-87-

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ATP: Adenosín tri-fosfato

BBB: Barrera hematoencefálica

BChE: Butirilcolinesterasa

C-HDL: Colesterol-Lipoproteínas de alta densidad

ChEs: Colinesterasas

C-LDL: Colesterol-Lipoproteínas de baja densidad

C-VLDL: Colesterol-Lipoproteínas de muy baja densidad

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FFA: Ácidos grasos libres

GSH: Glutación reducido

HFD: Dieta alta en grasas

HFS: Dieta alta en sacarosa y en grasas

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NAM: Nicotinamida

RER: Retículo endoplásmico rugoso

SNC: Sistema nervioso central

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TG: Triacilglicerolos

TLRs: Receptores tipo Toll

1. Introducción

1.1. Malos hábitos en la alimentación y enfermedades metabólicas

Los cambios en el estilo de vida, influenciados por la industrialización, urbanización y globalización del mercado, han llevado a un aumento acelerado en la prevalencia de la obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles. Debido en gran parte a la elevada disponibilidad de alimentos, factores como la oferta-demanda y a la publicidad, se promueve el consumo de alimentos con alto contenido en grasas y carbohidratos, principalmente en la población infantil (Rush & Yan, 2017).

Los hábitos alimenticios son significativos para una calidad de vida saludable. Sin embargo, el sedentarismo y la ingesta de alimentos con un alto contenido energético han propiciado el desarrollo de comorbilidades relacionadas con la obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hígado graso no alcohólico, así como algunos tipos de cáncer (Hu et al., 2001). Sumado a esto, la deficiente ingesta de alimentos con alto contenido en proteínas, fibras, vitaminas y minerales puede facilitar el desarrollo de enfermedades crónicas (Ye et al., 2012).

No obstante, de tener el conocimiento de lo que es saludable, hasta la fecha continúan los hábitos y preferencias adquiridos en el núcleo familiar; destacando la inclinación por alimentos con alto contenido de azúcares simples y grasas saturadas (Talip et al., 2017).

1.2. Carbohidratos: principal fuente de la dieta moderna

Los carbohidratos representan la fuente de energía de todas las células, esencial en diversos procesos metabólicos de los organismos vivos, específicamente la glucosa es la principal fuente energética (McKee & McKee, 2003, p. 234). En las últimas décadas, el consumo de glucosa y fructosa aumentó considerablemente en la población, generando preocupación por su elevado aporte calórico que provoca alteraciones metabólicas y problemas de salud que se complican con un estilo de vida sedentario (Pielak et al., 2019). Dentro de los productos con alto contenido en azúcares simples se incluyen las bebidas azucaradas, como los refrescos, las bebidas de frutas y las deportivas, que contienen jarabe de maíz alto en fructosa, concentrados de jugo de fruta o sacarosa. Estos productos han experimentado un aumento alarmante en su consumo debido a su intensa comercialización.

El consumo de carbohidratos a nivel mundial supera lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés); que es menor de 50 gramos por día, es un tema preocupante (WHO, 2018). En América Latina, en 2017, en promedio cada persona consumió 41.8 Kg por año, más del doble de lo recomendado (OECD-FAO, 2018). En este sentido, estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta de bebidas edulcoradas se asocia con obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad coronaria y cardiovascular; así como mayor riesgo de mortalidad (Malik et al., 2019).

La dieta diaria del humano incluye monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa) y disacáridos (sacarosa, lactosa y maltosa), a partir de una variedad de alimentos. No

obstante, en gran medida la glucosa y la fructosa forman parte del valor nutrimental de la dieta moderna y pueden contribuir al desarrollo de obesidad (Gonzalez & Betts, 2019). Cuando estos carbohidratos son ingeridos, se absorben a la luz intestinal a través de transportadores especializados. La glucosa utiliza principalmente GLUT2 (transportador de glucosa 2) y SGLT1 (transportador de glucosa dependiente de sodio 1), posteriormente ingresa y se metaboliza en músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo de una manera dependiente de insulina por medio del transportador GLUT4 (Daniel and Zietek, 2015). Por otro lado, la absorción de fructosa es un proceso independiente de insulina, llevado a cabo en el lado apical de la membrana de los enterocitos del intestino mediante el transportador GLUT5, mientras el transportador GLUT2 desplaza la mayor parte de fructosa hacia los vasos sanguíneos del lado basolateral del enterocito, para ser metabolizada principalmente en el hígado y en menor medida en los túbulos renales proximales (Ferraris et al., 2018).

Asimismo, la fructosa consumida en grandes cantidades es un factor de riesgo en el desarrollo de hígado graso debido a la acumulación de los triacilgliceroles (TG). La hidrólisis de la fructosa hepática aumenta las fuentes glucogénicas que resultan en una mayor lipogénesis y una reducida oxidación de ácidos grasos mitocondriales, llevando a un almacenamiento excesivo de tejido adiposo y generando intermediarios tóxicos como los diacilgliceroles y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) que inducen resistencia a la insulina y captación de lípidos en tejidos periféricos, respectivamente (Merino et al., 2019). Al igual que la fructosa, la

glucosa es considerada como un modulador del microbioma intestinal, y de manera crónica promueve la inflamación y permeabilidad en el intestino, causando una gran variedad de alteraciones metabólicas, entre ellas; la acumulación excesiva de lípidos en el hígado y la resistencia a la insulina en varios tejidos (Frazier et al., 2011).

Alternativo a lo mencionado, el consumo de carbohidratos simples incrementa la disponibilidad de sustratos para diferentes vías metabólicas, como; la lipogénesis hepática, la inhibición en la oxidación de ácidos grasos, así como la producción y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad. Estas alteraciones generadas por el consumo excesivo de carbohidratos simples causan aumento del tejido adiposo, provocando hipertrofia de este y eventualmente inflamación, que induce resistencia a la insulina en los adipocitos y liberación al torrente sanguíneo de ácidos grasos libres (FFA), los cuales pueden llegar a otros tejidos alterando su metabolismo (Rodríguez et al., 2020).

1.3 Las grasas de la dieta: metabolismo y efectos

Un tema igual de preocupante es el consumo de alimentos chatarra con alto contenido en grasas saturadas, que ha disparado un aumento en el sobrepeso y la obesidad, sobre todo en niños y jóvenes, haciéndolos más vulnerables al desarrollo de enfermedades crónicas (Castañeda et al., 2016).

Con el objetivo de mantener un peso corporal estable, el organismo tiende a mantener un ajuste entre la ingesta de calorías y el gasto energético, siempre y cuando el contenido de nutrientes consumidos sea igual a la cantidad de combustible

oxidado. A diferencia de los carbohidratos y las proteínas, las grasas de la dieta son más probables que se almacenen a que se oxiden y sean utilizadas como fuente energética en primera instancia (Fernández et al., 2007).

Una HFD influye en el metabolismo celular dependiendo de la composición del tipo de grasa. Por un lado, cuando nos referimos a alimentos elaborados a base de manteca de origen animal, los ácidos grasos saturados se relacionan con obesidad y resistencia a la insulina. Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados obtenidos del pescado tienen efectos benéficos, al mejorar la sensibilidad a la insulina (Eng & Estall, 2021). Debido a las enfermedades metabólicas generadas por las dietas, el interés se ha centrado en aquellos alimentos con alto contenido de grasas saturadas. Estos alimentos, al ser ingeridos, inmediatamente inician su digestión y los TG se descomponen por enzimas pancreáticas y sales biliares en FFA. Posteriormente, se absorben a nivel de enterocitos en el intestino delgado, son empaquetados en quilomicrones que pasan a circulación y son liberados para ser absorbidos por el tejido adiposo e hígado, provocando obesidad, hígado graso no alcohólico, lipogénesis hepática y resistencia a la insulina (Rodríguez et al., 2020).

Así, en general, el consumo de alimentos con alto contenido en grasas y carbohidratos ha sido reportado como uno de los principales factores en el desarrollo en enfermedades crónico-degenerativas (Teo et al., 2020). Diversas investigaciones han demostrado que el consumo diario de una dieta con elevado aporte de calorías provoca la acumulación de masa grasa, así como alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina, en las concentraciones de triacilgliceroles, colesterol y

cambios perjudiciales en la presión arterial (Zheng et al., 2016; Milanova et al., 2019). En conjunto, estas alteraciones desencadenan una inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidante que pueden afectar a órganos y tejidos, manifestándose como enfermedades crónicas.

1.4. Las dietas hipercalóricas: la inflamación y el estrés oxidante

La ingesta elevada de dietas hipercalóricas (sobrecarga energética), combinada con una baja actividad física, resultan en una acumulación de grasa en el tejido adiposo y ectópica generando un ambiente de estrés oxidante e inflamatorio (Jiang et al., 2021). Por un lado, el estrés oxidante ha sido implicado en la fisiopatología de varias enfermedades como resultado de una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), en especial el anión superóxido (O_2^-) como fuente mitocondrial de la cadena de transporte de electrones por la sobreproducción de ATP en un estado inicial al consumo de la dieta hipercalórica. Sin embargo, la causa principal del estrés oxidante es debido a un desbalance entre la producción de ERO/ERN (especies reactivas de nitrógeno) y la capacidad antioxidante (Singh et al., 2009; Jiang et al., 2021). Procesos biológicos como la respiración, la digestión y la biosíntesis hormonal tienen la capacidad de producir moléculas que favorecen el estrés oxidante, las cuales pueden ser inactivadas por las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas intracelulares, manteniendo la homeostasis redox. A pesar de ello, cuando las defensas antioxidantes son insuficientes, se altera el equilibrio redox, lo que afecta el metabolismo, la proliferación y la diferenciación celular mediante daño a las membranas celulares, las proteínas y al ADN (Silvestrini et al., 2023).

Además de aumentar el estrés oxidante, el consumo de dietas hipercalóricas induce inflamación crónica de bajo grado en aquellos tejidos donde es almacenada la grasa. El aumento en las ERO puede inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias que promueven a una disfunción celular y tisular, que desencadena en el desarrollo de comorbilidades como el hígado graso no alcohólico, la diabetes mellitus tipo II, la enfermedad cardiovascular y el síndrome metabólico, entre otras (Segula, 2014; Fonseca et al., 2020).

Las personas obesas con hígado graso no alcohólico presentan una respuesta inflamatoria específica de este tejido, evidenciando cambios patológicos que van desde la esteatosis a la esteatohepatitis, y con alto riesgo de progresar a la cirrosis y al carcinoma hepatocelular (McCullough, 2006). Sin embargo, aquellas personas obesas que no presentan anomalías en el hígado también muestran una inflamación de bajo grado crónica, lo que es indicativo de que otros tejidos podrían estar contribuyendo a la generación de moléculas inflamatorias como consecuencia de la acumulación de grasa ectópica (Bertola et al., 2010).

En el caso de la diabetes mellitus, las especies reactivas de oxígeno como el $O_2^{\cdot-}$ se producen en las células a partir de la activación de procesos como la respiración mitocondrial y la activación de NAD(P)H oxidasa (Siekmeier et al., 2007). La generación de las ERO contribuye a la activación del factor de transcripción factor nuclear kappa B (NF- κ B), traslocándose al núcleo e iniciando la transcripción de las citocinas proinflamatorias tales como: el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α),

Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-18 (IL-18) (Wright et al., 2006).

Por otro lado, se han analizado las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal relacionada con el consumo de una dieta hipercalórica, y se encontró que se modifica la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, así como la biotransformación de ácidos biliares, creando un ambiente inflamatorio y de estrés oxidante que afecta la permeabilidad del epitelio intestinal y la liberación de lipopolisacáridos a la periferia, que al unirse a receptores tipo Toll (TLRs) activan la vía de señalización para la síntesis de citocinas proinflamatorias (Gual et al., 2019).

El estudio sobre las dietas es de gran relevancia, debido a que la adiposidad es considerada un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Van Dyken & Lacoste, 2018). En los últimos años, se ha demostrado que los efectos de una dieta hipercalórica no se limitan a las alteraciones en tejidos periféricos, sino que además se generan modificaciones a nivel del sistema nervioso central (SNC), afectando la función cognitiva dependiente del hipocampo tanto en adultos como en adolescentes (Neha et al., 2014; Hargrave et al., 2016). Esto es alarmante y demanda atención oportuna, debido a que la adolescencia es un período de conformación neuroconductual necesario para el procesamiento cognitivo a lo largo de la vida (Hsu & Kanoski, 2014).

1.5. La dieta hipercalórica, permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y deterioro cognitivo

La señalización en el SNC requiere un microambiente altamente controlado para asegurar el correcto funcionamiento y la eficiencia de las comunicaciones neuronales. Este microambiente debe mantener condiciones óptimas para la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal, esenciales para procesos cognitivos complejos como el aprendizaje, la memoria, y el procesamiento sensorial (Abbott et al., 2010). La BBB es una estructura que desempeña un papel crucial en la protección del SNC al mantener el microambiente homeostático (Zhao et al., 2022). Esta estructura protege al cerebro y específicamente regiones como el hipocampo y a la corteza cerebral ante posibles daños asegurando que estas regiones críticas en la memoria y el aprendizaje se mantengan funcionales y saludables (Ueno et al., 2016).

El deterioro de estas áreas del cerebro se ha relacionado con modificaciones en la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés), una estructura vascular multicelular que separa el SNC de la circulación sanguínea periférica. La BBB está compuesta por células endoteliales unidas entre sí a través de complejos de uniones estrechas, uniones adherentes, una lámina basal, pericitos y pies perivasculares de los astrocitos que en conjunto con la microglía y las neuronas forman la unidad neurovascular (Cardoso et al., 2010; Brook, 2019). Como una interfaz mecánica, dinámica y especializada, es esencial para mantener la homeostasis de nutrientes y metabolitos que entran y salen del cerebro a través de receptores y transportadores,

protegiendo al SNC de aquellos agentes potencialmente dañinos que se encuentran en la circulación periférica, y que al atravesar la BBB podrían dañar diferentes regiones del cerebro (Zlokovic, 2011). No obstante, cuando estos sistemas de transporte del SNC se ven desregulados, se pierde el control de lo que entra y sale, lo que puede alterar la homeostasis cerebral y dañar diferentes regiones, entre ellas las que regulan funciones cognitivas. Por lo tanto, una pérdida en la estabilidad de la BBB podría ser un punto de crítico en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Noe, et al., 2020). En este sentido, la función de la BBB depende en gran medida de las uniones estrechas entre sus células endoteliales, constituidas por un conjunto de proteínas entre las que destacan las claudinas y ocludinas que impiden el libre flujo de sustancias entre las células (Sajja et al., 2016).

La alta ingesta de dietas hipercalóricas puede inducir neuroinflamación y estrés oxidante, afectando el hipocampo y la corteza cerebral, regiones de gran importancia por su función en el aprendizaje y la memoria (Shalev & Arbuckle, 2017). La dieta obesogénica se caracteriza por un fenómeno conocido como “lipotoxicidad” que tiene la capacidad de afectar la integridad de la BBB (Gao et al., 2014; van der Kolk et al., 2019; Liu et al., 2020) mediante efectos deletéreos por la acumulación de grasa, entre ellos la liberación de toxinas, células inmunes, moléculas inflamatorias y de estrés oxidante en la periferia que pueden llegar a la BBB, alterar su permeabilidad, cruzar a través de ella, y eventualmente afectar la estructura y función a las células gliales y las neuronas en regiones de gran importancia para la capacidad cognitiva (Van Dyken & Lacoste, 2018).

El incremento en la permeabilidad de la BBB a través de la inflamación se da por una regulación negativa en proteínas de las uniones estrechas, entre ellas Claudina-5, zonula occludens-1, occludinas y caveolina (Yoo et al., 2016). La inflamación sistémica sostenida por la dieta hipercalórica promueve la activación del factor de transcripción NF- κ B induciendo la síntesis de más citocinas proinflamatorias. Del mismo modo, el estrés oxidante generado por la dieta podría directamente afectar a la BBB alterando la integridad de la membrana de las células endoteliales, así como a los complejos de las uniones estrechas, dando lugar a un incremento en su permeabilidad y el paso libre de moléculas que comprometen la funcionalidad de diferentes regiones del cerebro (Varatharaj & Galea, 2017). Cabe mencionar que las ERO son mediadores de inflamación y como subproductos de la actividad de NADPH oxidasa pueden alterar la estructura y función de proteínas, pero también pueden activar la vía de señalización de NF- κ B y promover la síntesis de citocinas (Mittal et al., 2014; Hoesel & Schmid, 2013). La inflamación y el estrés oxidante irrumpen los pies perivasculares de los astrocitos afectando la integridad de la BBB, al mismo tiempo los astrocitos cambian a un estado proinflamatorio y citotóxico induciendo la expresión de quimiocinas que reclutan células inmunes hacia las células endoteliales promoviendo su extravasación, así como la difusión de solutos, patógenos y toxinas a través de la BBB hacia el SNC estimulando aún más la inflamación y el estrés oxidante (Zamanian et al., 2012).

De acuerdo con lo antes mencionado, la inflamación y el estrés oxidante son alteraciones generadas por el consumo de una alta ingesta de dietas hipercalóricas que promueven un aumento en la permeabilidad de la BBB y un mayor riesgo de

padecer deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas (Pistell et al., 2010; Flores-Cordero et al., 2022; Ly et al., 2023).

En el año 2022, en México, la estimación de la obesidad y el sobrepeso incrementó con respecto al año 2018, pasando de un 38.4 % a 41.1 % respectivamente (ENSANUT, 2022). Así mismo, en el año 2016, la WHO reportó que 2, 240 millones de personas incluyendo niños, jóvenes y adultos padecieron de sobrepeso u obesidad (WHO, 2015). En este sentido, el consumo de dietas hipercalóricas y la obesidad son factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, debido a que en esta enfermedad, la inflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante son mecanismos neurodegenerativos presentes (Pugazhenthir et al., 2017), y que al mismo tiempo afectan al sistema colinérgico, alterando la actividad de las colinesterasas (ChEs) y las concentraciones del neurotransmisor acetilcolina (ACh), modificaciones que disminuyen la sinapsis colinérgica promoviendo deterioro cognitivo (Hampel et al. 2018). La WHO declaró en 2021 que a nivel mundial había 55 millones de personas con demencia y hasta un 70 % son casos de enfermedad de Alzheimer, los cuales aumentan casi 10 millones cada año (WHO, 2021). Las alteraciones en el sistema colinérgico en la enfermedad de Alzheimer se han abordado por muchos años, incluso con tratamientos para regularlas, sin embargo, aún no se logran entender completamente los mecanismos, específicamente aquellos que implican a las ChEs y el neurotransmisor ACh.

1. 6. *Propiedades de las colinesterasas (ChEs)*

Las ChEs pertenecen a una familia de enzimas que son hidrolasas especializadas en descomponer los ésteres de colina; la familia incluye a la acetilcolinesterasa (AChE; E.C.3.1.1.7) y a la butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8). La AChE, también llamada “colinesterasa verdadera” hidroliza al neurotransmisor ACh en colina y acetato, un evento que finaliza la transmisión sináptica, y se encuentra principalmente en uniones neuromusculares y en las sinapsis colinérgicas del SNC.

La BchE, también conocida como “pseudocolinesterasa” o “colinesterasa sérica”, hidroliza butirilcolina y succinilcolina, pero también tiene la capacidad de usar como sustrato a la ACh. La proteína BchE es sintetizada principalmente en el hígado, pero se puede detectar su actividad en otros órganos periféricos, suero y en el SNC (Lionetto et al., 2013).

La AChE es una enzima de gran importancia en la sinapsis colinérgica y para llevar a cabo su función requiere modificaciones post-traduccionales, siendo la glicosilación la más sobresaliente (Rotundo, 2017). En vertebrados, el gen ACHE mediante un proceso alternativo de corte y empalme puede generar tres variantes de transcritos quienes comparten un 95 % de similitud en su secuencia nucleotídica, sin embargo, difieren en su extremo carboxilo-terminal (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Las variantes incluyen al transcrito AChE-S o AChE-T (“S” indica sináptico o “T” indica “con tallo”) por la isoforma que codifica (Massoulié et al., 1993; Soreq & Seidman 2001; Massoulié, 2002); la AChE-E (“E” indica eritrocítica; también se conoce como AChE-H, “H” indica hidrofóbica) (Coussen et al. 2001); y el transcrito “read- through”

AChE (AChE-R), que se genera por el corte-empalme alternativo en la región 3' (Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002).

El transcrito AChE-T(S) codifica a las isoformas hidrofílicas (hidrosolubles) como los monómeros (G_1^H), dímeros (G_2^H), tetrámeros (G_4^H); a formas moleculares anfifílicas como los monómeros (G_1^A), dímeros (G_2^A) y tetrámeros (G_4^A) anclados a la membrana por un péptido hidrofóbico rico en prolina (PRIMA) (Rakonczay, 2003; Lane et al., 2006); y a formas denominadas asimétricas, como los tetrámeros unidos a triple hélice tipo colágeno, ejemplo A_4 (1 tetrámero), A_8 (2 tetrámeros) y A_{12} (3 tetrámeros) (Massoulié et al., 1993). Mientras que el transcrito AChE-E (H) codifica a monómeros y dímeros que pueden anclarse a la membrana plasmática a través de un enlace glicofosfatidilinositol (GPI). Finalmente, la variante soluble AChE-R codifica a una forma molecular monomérica hidrosoluble, que es inducida en situaciones de estrés (Lionetto et al., 2013; Rotundo, 2017).

La BChE es codificada por el gen BCHE, que genera un solo transcrito BChE-T, para la síntesis de formas moleculares hidrofílicas: monómeros (G_1^H), dímeros (G_2^H) y tetrámeros (G_4^H) y formas moleculares anfifílicas: monómeros (G_1^A), dímeros (G_2^A), tetrámeros (G_4^A) (Rakonczay, 2003; Lane et al., 2006). El hígado es el principal órgano productor de la enzima BChE. Este órgano posee la capacidad de sintetizar dos tipos de reservorios de la enzima, uno de la actividad propia del órgano y la segunda, que se depositará en el plasma (Gómez et al., 2000). También se ha detectado en el estómago, el riñón, pulmón, músculo, cerebro, entre otros tejidos (López et al., 2018). Es una enzima que hidroliza ésteres de colina y no colina, principalmente succinilcolina y propionilcolina. Su deficiencia se puede generar de

forma hereditaria, viéndose más afectados aquellos con ascendencia europea y asiática, o adquirida, incluyendo a personas de edad avanzada, envenenamiento por organofosforados, desnutrición, entre otras condiciones patológicas (Chen et al., 2017). La deficiencia en esta enzima genera una mayor sensibilidad a medicamentos relajantes musculares; ésteres de colina como la succinilcolina, así como a los plaguicidas, la cocaína y los anestésicos. Debido a que se le ha atribuido la capacidad de secuestrar compuestos tóxicos, BChE puede proteger de una gran variedad de sustancias administradas e inhaladas (Macdonald et al., 2017; López et al., 2018).

Ambas ChEs son glicoproteínas, la AChE posee tres sitios potenciales de N-glicosilación, y la BChE presenta ocho sitios potenciales. En el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) se les incorpora a las ChEs un oligosacárido rico en manosa en el residuo de aminoácido de asparagina. Se remodela el oligosacárido por la acción de glucosidasas y manosidasas. La proteína sale del RER hacia el Complejo de Golgi por transporte vesicular, en las diferentes cisternas de este organelo se incorporan y eliminan otros carbohidratos, siendo indispensables para que adquiera una estructura tridimensional adecuada para que cumpla su función, además de definir la vida circulatoria de ambas proteínas (Cabezas-Herrera et al., 1997). La porción glicosídica que se incorpora a la porción proteínica de las ChEs llega a representar un 10% del peso molecular en el caso de la AChE y hasta un 20% de la BChE (Cabezas-Herrera et al., 1997).

Las actividades elevadas y sostenidas de las ChEs favorecen la hidrólisis de la ACh, un neurotransmisor asociado a la vía colinérgica anti-inflamatoria que regula la

respuesta inmunitaria y la secreción de citocinas (Rao et al., 2007). Por tanto, es factible que el aumento de la actividad de las ChEs contribuya a un ambiente pro-inflamatorio (Rojas et al., 2017).

1.7. La vía colinérgica anti-inflamatoria y el papel de las ChEs

La ACh es un neurotransmisor ampliamente estudiado en la regulación de la sinapsis neuromuscular, no obstante, en las últimas décadas en células distintas a las neurales se le han atribuido propiedades anti-inflamatorias, donde se describen las interacciones entre el SNC y el sistema inmune a través del nervio vago denominándose como la “vía colinérgica anti-inflamatoria”. Dicha vía anti-inflamatoria explica cómo la ACh liberada de células inmunes y neuronas colinérgicas modula la función inmune de forma autócrina o parácrina al interactuar con sus receptores (Han et al., 2017).

La vía colinérgica anti-inflamatoria es un mecanismo que consiste en la unión del neurotransmisor ACh a la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de ACh, donde la unión del neurotransmisor y el receptor activa vías de señalización que inhiben la síntesis de citocinas proinflamatorias. La regulación de moléculas de inflamación a partir de esta vía puede llevarse a cabo en tejidos periféricos a través de los macrófagos, ya que cuentan con el receptor nicotínico de ACh $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) por lo que ACh se puede unir con su receptor y de esta manera parar la inflamación, mientras que a nivel de SNC los astrocitos, la microglia y las neuronas colinérgicas cuentan con la maquinaria necesaria para llevar a cabo esta vía anti-inflamatoria (Rosas & Tracey, 2009; Wu et al., 2021). El $\alpha 7$ nAChR es uno de los principales

subtipos de receptores expresados en el cerebro y su importancia radica en funciones tales como el aprendizaje, la plasticidad sináptica, la memoria, la locomoción, la atención y la ansiedad (Egea, et al., 2015). Este receptor es un homopentámero formado por 5 subunidades $\alpha 7$ idénticas y presenta características funcionales únicas, entre sus características; tiene una alta permeabilidad para calcio y una rápida fase de activación y desensibilización (Piovesana et al., 2021). En células no neuronales, como las células inmunes y gliales, el $\alpha 7$ nAChR media respuestas antiinflamatorias a través de las vías de señalización Jak2/STAT3 y PI3K/Akt. En macrófagos de ratón, la activación de $\alpha 7$ nAChR conduce a la fosforilación de Jak2 y STAT3, bloqueando la translocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) al núcleo y reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6). Además, STAT3 fosforilado regula positivamente la transcripción de SOCS3, mientras que la activación de $\alpha 7$ nAChR también promueve la actividad del factor nuclear relacionado con eritroide 2 (Nrf2), que coordina la resistencia a oxidantes y la expresión de genes antioxidantes como HO-1. La vía de Nrf2, mediada por la señalización PI3K/Akt, es crucial para la neuroprotección, evidenciada por los efectos neuroprotectores del agonista $\alpha 7$ nAChR PNU-282987 en modelos de ictus en ratones. En conjunto, estas vías de señalización metabotrópicas destacan la importancia de $\alpha 7$ nAChR en la modulación de respuestas inflamatorias y la protección neuronal (de Jonge et al., 2015; Parada et al., 2013).

En el sistema nervioso central, la activación de los receptores nicotínicos de acetilcolina alfa-7 ($\alpha 7$ nAChR) en las células gliales de ratón, como la microglía y los

astrocitos, media una respuesta antiinflamatoria a través de la vía metabotrópica. En la microglía, esta activación implica la activación de la fosfolipasa C (PLC) vía Gq, lo que induce la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El aumento de calcio intracelular disminuye la fosforilación y activa las quinasas MAP, como JNK, p38 y p44/42, que regulan la síntesis y liberación de moléculas inflamatorias y tóxicas como $\text{TNF}\alpha$, IL-6 y óxido nítrico (NO), previniendo así la activación crónica y promoviendo una resolución de la respuesta inmune aguda (Suzuki et al., 2006). La "vía colinérgica antiinflamatoria del cerebro" ejerce neuroprotección al disminuir las reacciones inflamatorias. Además, los astrocitos y la microglía expresan acetiltransferasa de colina y varios receptores colinérgicos, lo que les otorga la capacidad de sintetizar ACh y responder a estímulos colinérgicos de manera autocrina y/o paracrina (Han et al., 2017).

Debido a la función de la ACh en la inflamación, es sumamente importante regular la actividad de las ChEs, especialmente sobre la AChE, debido a que cuando existe una elevada actividad de esta enzima, persiste la hidrólisis del neurotransmisor, impidiendo que pueda llevarse a cabo la vía colinérgica anti-inflamatoria (Rosas & Tracey, 2009).

El aumento en la actividad de las ChEs en SNC generan una mayor hidrólisis de ACh, esto ha sido atribuido a un incremento al estrés oxidante y a la inflamación por el consumo de alimentos con alto contenido calórico, por lo que en este sentido se ha propuesto que las vitaminas por su efecto antioxidante y anti-inflamatorio podrían prevenir el aumento en la actividad de las ChEs y por ende el deterioro cognitivo.

1.8. Los antioxidantes como una potencial alternativa terapéutica

Naturalmente, existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que pueden prevenir o retrasar algún tipo de daño celular (Li et al., 2015). Los antioxidantes son moléculas que funcionan como mecanismos de defensa capaces de neutralizar a las ERO impidiendo que no reaccionen con biomoléculas de las células y así evitar modificarse en su estructura y función (Malekmohammad et al., 2019). Debido a esto, se ha estipulado que los antioxidantes son útiles para prevenir diversas enfermedades (Berger et al., 2012). Recientes investigaciones en este campo sugieren el uso de algunas vitaminas por el organismo como compuestos bioactivos importantes para la salud, ya que participan en diversas funciones bioquímicas que contribuyen al buen funcionamiento de las células (Spector & Johanson, 2007).

1.9. Las vitaminas y su importancia en el metabolismo celular

Las vitaminas son un grupo de compuestos orgánicos que no pueden ser sintetizados por nuestro organismo, pero son elementales para el funcionamiento fisiológico, por lo que deben ser obtenidas en cantidades adecuadas a través de la dieta. Nuestro cuerpo necesita obtener de la dieta un total de 13 vitaminas, de las cuales cuatro son liposolubles (A, D, E y K) y las otras nueve hidrosolubles (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 y B12) (Kennedy, 2016). Como se ha mencionado, las vitaminas son componentes de la dieta y son necesarias para la vida, por lo que su ingesta inadecuada está asociada con el desarrollo y/o mantenimiento de enfermedades crónicas degenerativas y neurodegenerativas como la enfermedad de

Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, en las que se provoca estrés oxidante y muerte neuronal afectando la capacidad cognitiva, por lo que se ha sugerido que el consumo de vitaminas con capacidad antioxidante podría ser benéfico por sus efectos neuroprotectores ante el desarrollo de estas enfermedades (Etminan et al., 2005).

1.10. La nicotinamida (NAM), una vitamina esencial para la protección antioxidante

Una de las vitaminas que ha sido considerada de estudio por su capacidad antioxidante y anti-inflamatorio, es la NAM, una forma de vitamina B3 hidrosoluble y precursora de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), coenzima que en su forma fosforilada reducida $[\text{NAD(P)H}]$ y fosforilada oxidada $[\text{NAD(P)}^+]$, participa en la transferencia de electrones a través de una serie de reacciones de oxidación-reducción implicadas en el metabolismo celular y utilizadas como cofactor en la expresión génica, la reparación del ADN y la restauración de los sistemas antioxidantes (Thompson et al, 2008; Fricker et al., 2018; Gasperi et al., 2019).

La NAM puede ser obtenida a través de alimentos no procesados de fuente animal y vegetal, tales como; la carne, el pescado y los granos de cereal, por mencionar a algunos, que contienen altas cantidades de esta vitamina en comparación con alimentos procesados (Pitche, 2005). Una deficiencia severa en los niveles de esta vitamina por su mala absorción o por su bajo consumo provoca varios síntomas como la diarrea, dermatitis y demencia, a los cuales en conjunto se le conoce como pelagra, (Gasperi et al., 2019). Para el tratamiento de la pelagra se pueden ingerir hasta los 300 mg/día de NAM, sin embargo, en concentraciones más elevadas puede

ejercer funciones farmacológicas relacionadas con el tratamiento de cáncer, al sensibilizar a los tumores a la radiación o a la quimioterapia (Gasperi et al., 2019).

La participación de la NAM en el metabolismo energético es muy importante, ya que a través de la utilización de NAD^+ en la cadena de transporte de electrones mitocondrial se lleva a cabo la producción de ATP, mejorando la supervivencia neuronal en ambientes de estrés oxidante y mejorando los niveles de ATP (Ullah et al., 2011). La NAM aumenta las concentraciones de NADPH, una coenzima necesaria para que la enzima glutatión reductasa aumente los niveles de GSH (glutatión) y una disminución en la producción de ERO mejorando la función mitocondrial y la supervivencia celular (Choi et al., 2015). Además, se le atribuye una función anti-inflamatoria, al disminuir la expresión de varios mediadores proinflamatorios, entre ellos el factor nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) a través de la desacetilación por la SIRT1, una enzima que requiere de NAD^+ como sustrato para llevar a cabo su actividad (Maiese et al., 2009; Fania et al., 2019).

A nivel del SNC, se ha reconocido la relevancia significativa de la NAM debido a sus efectos en la neurogénesis. La NAM acelera la diferenciación de las células madre embrionarias y también favorece la supervivencia de las células nerviosas, especialmente en situaciones de estrés oxidativo. Esto sugiere que la biosíntesis de NAM está activa en el SNC, dado que se encuentran concentraciones significativas de sus precursores en el rango micromolar o nanomolar (Gasperi et al., 2019).

Por sus propiedades, se ha propuesto a la NAM como un agente protector contra ERO, excitotoxicidad, disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina en enfermedades metabólicas y neurodegenerativas (Maiese, 2021).

2. Antecedentes

Debido a que la alta disponibilidad y consumo de productos alimenticios procesados y palatables es una de las principales causas de alteraciones metabólicas en tejidos periféricos y en el SNC, esto a su vez podría modificar el comportamiento neuroconductual.

En primera instancia, cuando la permeabilidad de la BBB se ve alterada, se pierde el control de lo que entra y sale del SNC, lo que puede dañar la salud cerebral y las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Leigh & Morris, 2020). Debido a esto, una pérdida en la estabilidad de la BBB es el punto de partida en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Noe, et al., 2020). Como evidencia de lo antes mencionado, un estudio en el que se administró una dieta alta en grasas (HFD) en roedores demostró que la dieta generó modificaciones en los niveles de expresión de proteínas de microvasos de la corteza cerebral, evidenciando que proteínas relacionadas con el metabolismo celular, ciclo celular, transporte, asociadas a citoesqueleto y necesarias para el plegamiento de otras proteínas estaban desreguladas, mientras proteínas nucleares relacionadas con el corte y empalme del mRNA y su transporte se mostraron sobrerreguladas dejando ver que las dietas pueden generar un estrés metabólico a nivel de la BBB y una disminución

en su eficiencia a nivel de distintos compartimentos subcelulares y alterar su funcionalidad (Ouyang et al., 2014).

Cuando la BBB es afectada en estructura y función, se modifican principalmente las células endoteliales y los niveles en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas. Experimentos en ratones alimentados con una HFD revelaron un desequilibrio dietético al presentar neuroinflamación caracterizada por incremento de citocinas proinflamatorias y de las ERO. Además, se manifestaron niveles elevados de GFAP y S100 β , marcadores que indican astrogliosis y al mismo tiempo neuroinflamación. También, se observó un incremento en el contenido de albúmina en el hipocampo, lo que indicó una disrupción en la BBB, con los niveles disminuidos de Claudina 5, una proteína de las uniones estrechas con mayor expresión en condiciones normales. Este aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica favorece la trans migración de células inmunes y moléculas periféricas causando neuroinflamación, lo que podría afectar directamente al hipocampo provocando mal funcionamiento neuronal conduciendo a déficit cognitivo (de Aquino et al., 2019). Además, cuando se administró una dieta obesogénica en ratas por un periodo de 90 días, se observó un incremento en la permeabilidad de la BBB en varias subregiones del hipocampo (Hargrave et al., 2016).

La BBB también utiliza un sistema de transporte especializado y altamente selectivo, lo que le permite mantener el equilibrio entre lo que entra y sale del SNC; sin embargo, sus sistemas de transporte son afectados por la inflamación sistémica y el estrés oxidante generados por la dieta (Hsu & Kanoski, 2014). En este sentido, las

ERO pueden favorecer la resistencia a la insulina, una hormona indispensable para la captación de glucosa en tejidos periféricos también desempeña la función de regular la ingesta de alimentos a nivel hipotalámico, además la acción de esta hormona se extiende a otras regiones del SNC, entre ellos el hipocampo. Entre las funciones de la BBB, está la regulación de la entrada de la insulina y de varias moléculas al SNC, las cuales eventualmente tendrán una función. Para que la insulina llegue al hipocampo, tiene que cruzar la BBB por medio de un sistema de transporte saturable y así poder unirse a sus receptores en el hipocampo o en otras regiones (Fadel & Reagan, 2016). En modelos en roedores de diabetes mellitus tipo 2 inducida por una HFD se presenta un deterioro en la función cognitiva como resultado de la alteración en la BBB afectando el transporte de la insulina e impidiendo que esta llegue al hipocampo, como resultado disminuye la neuroplasticidad en esta región del cerebro provocando deterioro en procesos de memoria y aprendizaje (McNay et al., 2010; Reichelt et al., 2018).

El hipocampo cuenta con neuronas piramidales, las cuales tienen una alta demanda metabólica, por lo que son especialmente sensibles a daño biológico. Su función depende en gran medida de las mitocondrias para obtener energía y las anomalías en este organelo compromete la funcionalidad del hipocampo (Michaelis, 2012). La dieta es uno de los factores que puede dañar el hipocampo debido a sus componentes, principalmente cuando se trata de alimentos que contienen ácidos grasos saturados y azúcares simples que afectan la capacidad cognitiva a las 72 horas del consumo de la dieta, causando una reducción en la

densidad dendrítica junto con la plasticidad sináptica (Stranahan et al., 2008; Kanoski & Davidson, 2010). Hallazgos en experimentos realizados en ratas a las cuales se les administró una dieta hipercalórica mostraron que los animales presentaron un deterioro en la memoria cuando se analizó a través de una prueba de reconocimiento de objetos en comparaciones con ratas alimentadas con una dieta estándar, aun sin haber mostrado cambios en los niveles de las citocinas; TNF- α e IL-1 β (Zanini et al., 2017). Por otra parte, en ratones una HFD provoca pérdida neuronal en el hipocampo a través de alteraciones en el estrés oxidante mediante un incremento en las TBARS y en las proteínas carboniladas, así como sobre la regulación de genes relacionados a la inflamación en cerebro como IL-6, TNF- α y TLR-4, lo cual fue confirmado por una notable activación de astrocitos. En este mismo experimento se detectaron niveles elevados de la proteína beta-amiloide (β A) y de la proteína Tau hiperfosforilada, dos marcadores característicos de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Ko et al., 2019). Los hallazgos descritos previamente evidencian marcadores moleculares que a la HFD se le ha atribuido inducir estrés oxidante, neuroinflamación y la acumulación de proteínas que promueven muerte neuronal y deterioro cognitivo.

Evidencias recientes indican que el cerebro se ve afectado por una inflamación periférica, debido al consumo crónico de una dieta obesogénica, provocando la activación de la microglía, lo que conduce a un estado de neuroinflamación (Oriá et al., 2016). Además, la activación de estas células gliales induce un incremento en las ERO y al mismo tiempo cambios en el metabolismo de glutamato en estas células

gliales, disminuyendo la eficiencia en el sistema antioxidante de glutatión, ya que el glutamato es uno de los aminoácidos esenciales para la síntesis de *ново* de glutatión, lo que deja de alguna manera desprotegido al SNC del estrés oxidante (Milanova et al., 2019).

El daño o afectación en el hipocampo inducido por la neuroinflamación se puede ver reflejado en un cambio en los niveles de actividad enzimática, tal es el caso de las colinesterasas, quienes cumplen una función relevante en las sinapsis de esas regiones asociadas con el aprendizaje y la memoria (Sodhi & Singh, 2013).

Duchnowicz y colaboradores (2018) realizaron un estudio en jóvenes que habían desarrollado síndrome metabólico y observaron que la actividad de AChE y BChE en suero estaban incrementadas junto con un aumento en el nivel de lipoperoxidación. Por otra parte, en el cerebro un aumento en la actividad de AChE es muy relevante, ya que, en personas con la enfermedad de Alzheimer se ha reportado un aumento en la actividad de las ChEs, principalmente AChE, lo que causa una deficiencia en la concentración del neurotransmisor ACh, viéndose afectada la sinapsis y conduciendo a un deterioro cognitivo (Sodhi & Singh, 2013).

En la actualidad, no es claro si la actividad de BChE es importante en la progresión de la enfermedad de Alzheimer; no obstante, en pacientes que padecen esta enfermedad se ha determinado un aumento en su actividad (Macdonald et al., 2017).

Se han reportado evidencias donde se muestra que la administración de una HFD causa un incremento en la actividad de AChE y BChE en cerebro, situación que lleva

a una mayor hidrólisis de la ACh, por lo que su concentración disminuye y con ello un incremento en la inflamación cerebral, adjudicando a las ChEs una función proinflamatoria que contribuye al deterioro cognitivo (Amin et al., 2011; Sodhi & Singh, 2013). En este contexto, las investigaciones actuales en este campo sugieren el uso de algunas vitaminas, como compuestos bio-activos importantes para la salud (Fricker et al., 2018).

Debido al incremento del estrés oxidante y la neuroinflamación generada por las dietas con alto contenido calórico, la NAM es un posible agente protector con la capacidad de atenuar estas alteraciones metabólicas y prevenir el deterioro cognitivo (Maiese, 2021). Experimentos en cultivo de neuronas tratadas con la NAM, la vitamina ejerce un efecto neuroprotector mediante mecanismos que aumentan los niveles en la expresión de genes que codifican para proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs; NAIP, CIAP1, and CIAP2), inhibidores únicos de las caspasas (Bhansali et al., 2006). La supervivencia celular por la administración de NAM se debe en gran medida a un aumento en las concentraciones de NAD⁺, lo que a su vez aumenta los niveles de ATP manteniendo las cantidades necesarias de energía para la función neuronal en modelos de isquemia cerebrovascular donde es común un estrés bioenergético por los niveles disminuidos en NAD⁺ (Lee et al., 2006; Liu et al., 2009).

Un estudio realizado en ratas en etapa juvenil, a las cuales se les indujo un daño cerebral traumático en la zona cortical y presentaron pérdida cortical acelerada, así como activación en la microglía; la administración de NAM mostró una pérdida

cortical más lenta y una actividad de la microglía disminuida, causando una menor muerte neuronal (Smith et al., 2019).

Uno de los beneficios más importantes de NAM es el mantenimiento de la homeostasis redox, es decir, protección ante la generación de las ERO. En modelos de cultivo de fibroblastos humanos, la administración de la NAM disminuyó las ERO (radical superóxido) mitocondriales, mientras aumentó los niveles en la relación NAD^+/NADH . Por los hallazgos obtenidos, NAM tiene un efecto directo en modulación redox de la coenzima NAD^+ celular, así como en la relación NAD^+/NADH mitocondrial para un óptimo metabolismo celular (Song et al., 2017).

La NAM como precursor de NAD^+ incrementa los niveles de NADPH , ejerciendo una función antioxidante muy importante en el reciclado del GSH en su forma reducida mediante la enzima glutatión reductasa que depende de NADPH para aumentar los niveles de GSH y disminuir los niveles de las ERO, así demostrado en un modelo de ratas suplementadas con dieta hipercalórica (Song et al., 2017; Mejía et al., 2018).

La NAM es la forma de vitamina B3 con más prevalencia en el cerebro, pues, aunque se sabe que el ácido nicotínico cruza la BBB, este es convertido rápidamente a nicotinamida (Spector, 1979). Se ha propuesto que la NAM ejerce un efecto protector contra condiciones neurodegenerativas, específicamente en la señalización dependiente de NAD^+ y su función protectora contra la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en la neurodegeneración (Franco & Vargas, 2018). Por lo tanto, la NAM podría contrarrestar los efectos deletéreos generados por una dieta

hipercalórica evitando alteración en la permeabilidad de la BBB y previniendo el deterioro cognitivo.

3. Justificación

El consumo excesivo de dietas hipercalóricas promueve diversas desregulaciones metabólicas, generando un ambiente de inflamación crónica y estrés oxidante sistémicos que afectan a diferentes órganos y tejidos, tanto periféricos como en el SNC, comprometiendo la permeabilidad de la BBB en hipocampo y su función cognitiva. Por este motivo, en los últimos años se buscan alternativas terapéuticas que ayuden a prevenir o atenuar el deterioro cognitivo, destacando el uso de las vitaminas. En particular, la NAM, debido a su efecto antioxidante y anti-inflamatorio; así como su importancia en el metabolismo celular, podría resguardar la integridad de la BBB y prevenir el deterioro cognitivo inducido por la alta ingesta de dietas hipercalóricas.

4. Pregunta de investigación

¿NAM protegerá la integridad de la BBB en hipocampo y con ello disminuirá el deterioro cognitivo, a través de reducir el estrés oxidante, la inflamación y la actividad de las ChEs alterados por la ingesta de una dieta HFS en ratas?

5. Hipótesis

NAM protege la integridad de la BBB y mejora la capacidad cognitiva al disminuir la inflamación, el estrés oxidante y la actividad de las ChEs en hipocampo de ratas alimentadas con una HFS.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto de NAM sobre la permeabilidad de la BBB en hipocampo, su correlación con la actividad de las ChEs y el déficit cognitivo en ratas alimentadas con una dieta HFS.

6.1. Objetivos específicos

- Analizar los parámetros bioquímicos, las citocinas proinflamatorias y los FFA libres en suero de ratas sometidas a una dieta HFS y con tratamiento de NAM.
- Determinar los marcadores de estrés oxidante en suero y en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta HFS y con tratamiento de NAM.
- Determinar la actividad específica de AChE y BChE en suero y en el hipocampo de ratas alimentadas con una dieta HFS y con tratamiento de NAM.
- Evaluar la permeabilidad de la BBB en el hipocampo de ratas sometidas a una dieta HFS y con tratamiento de NAM.
- Evaluar la memoria y el aprendizaje espacial en ratas alimentadas con una dieta HFS y con tratamiento de NAM.

7. Materiales y métodos

7.1. El manejo ético de los animales

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2015) para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Local de Investigación y Ética en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS; R-2020-3601-257).

7.2. Los animales y los tratamientos

Cuarenta ratas macho Sprague-Dawley (250 ± 5 g) fueron proporcionadas por el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Una semana antes de iniciar los experimentos, las ratas fueron aclimatadas a periodos de luz/oscuridad (12/12 h), con ventilación para asegurar condiciones óptimas de humedad (50 %) y de temperatura (23 °C). Posteriormente, los animales se alojaron individualmente en cajas de acrílico y se dividieron aleatoriamente en cinco grupos (n=8 por grupo). Uno de los grupos fue alimentado con una dieta estándar (LABDIET 5008: 6.5 % de grasa, 23 % de proteínas y 46.5 % de carbohidratos; grupo CONTROL) y agua natural. Los 4 grupos restantes fueron alimentados con una dieta alta en grasas (HFD; 18.5 % de grasa, 15 % de proteínas y 45.05 % de carbohidratos) y recibieron agua para beber con sacarosa al 40 % (grupo HFS; dieta hipercalórica). En tres de los grupos alimentados con la dieta HFS, la bebida azucarada de cada grupo se sustituyó 5 horas por la mañana, durante 5 días a la semana por un bebedero con agua que contenía NAM a concentraciones de 5, 10 y 15 mM (grupos HFS-NAM5, HFS-NAM10 y HFS-NAM15). Transcurrido este tiempo de 5 horas, se retiraron los tratamientos con la NAM para continuar con la administración de la bebida con sacarosa al 40 %. Todos los tratamientos se llevaron a cabo durante 12 semanas, a

libre acceso. Durante el período de tratamiento, se registraron el consumo de alimento y el peso corporal tres veces por semana (Figura 1).

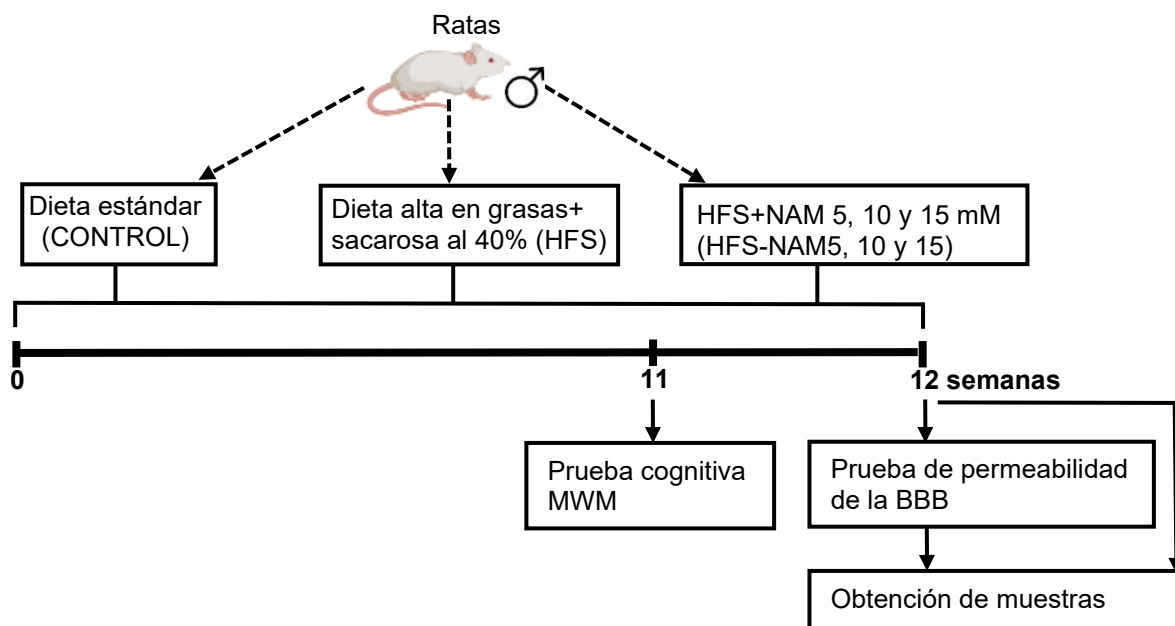


Figura 1. Diseño experimental de la administración de la dieta HFS y el tratamiento con NAM. CONTROL; dieta estándar, HFS; dieta alta en grasas + sacarosa al 40%, HFS-NAM5, 10 y 15; HFS + Nicotinamida 5, 10 y 15 mM, MWM; laberinto acuático de Morris, BBB; barrera hematoencefálica.

7.3. Determinación de glucosa en ayuno

Al finalizar los tratamientos, todos los animales se dejaron en ayuno por 6 h y se les midió la concentración basal de glucosa en muestras de sangre colectadas de la vena de la cola con un glucómetro FreeStyle Optium (Laboratorios Abbott, Madrid, España).

7.4. Ensayo de memoria y aprendizaje espacial

La prueba del laberinto acuático de Morris (Morris, 1984) para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial se llevó a cabo a las 11 semanas de tratamiento y 24 h después de la prueba de tolerancia a la glucosa. La prueba requirió de una piscina (dimensiones: 150 cm de diámetro, 50 cm de profundidad) dividida en cuadrantes virtuales, y en las paredes de cada cuadrante se colocaron figuras de papel con diferente forma y color. En el centro de uno de los cuadrantes se colocó una plataforma de acrílico transparente (25 x 12 x 12 cm). La piscina se llenó (3/5) con agua teñida con violeta de genciana, y se mantuvo a una temperatura de 26 ± 2 °C, asegurándose de que la plataforma permaneciera 2 cm por debajo del nivel del agua.

El experimento consistió en 2 etapas: entrenamiento y retención. En la etapa de entrenamiento (aprendizaje), se colocó a las ratas en uno de los cuadrantes de cara a la pared, dejándola nadar durante 60 s y se registró el tiempo que le llevó encontrar la plataforma oculta (latencia); si la rata encontraba la plataforma antes de 60 s, se le dejaba sobre ella durante 15 s. En caso contrario, se la conducía hasta la plataforma, se la dejaba sobre ella durante 15 s, y luego se la devolvía a su jaula de origen. Cada rata realizó la prueba diariamente desde cada cuadrante de la piscina durante 5 días consecutivos.

Tras el periodo de entrenamiento, las ratas descansaron durante 2 días. En la etapa de retención (memoria), primero se retiró la plataforma y posteriormente se colocaron a las ratas en el cuadrante opuesto en relación con la ubicación original de la plataforma. Se permitió a las ratas nadar durante 60 s, registrando el tiempo que nadaban en el cuadrante donde estaba colocada la plataforma. Luego de los 60 s de

la prueba, las ratas fueron retiradas de la piscina. Todas las pruebas se grabaron en vídeo y fueron analizadas manualmente por un juez a ciegas (Figura 2).

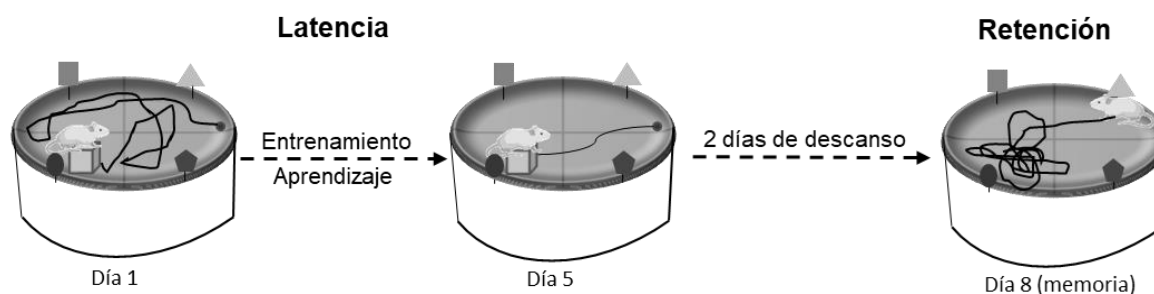


Figura 2. Prueba del Laberinto Acuático de Morris para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas. La prueba constó de dos fases: una fase de latencia de cinco días, donde se registró el tiempo que tardaron las ratas en localizar una plataforma oculta en la piscina después de ser liberadas durante un intervalo de 60 segundos; y una fase de retención, donde la plataforma fue retirada y se registró el tiempo que las ratas pasaron nadando en el cuadrante donde originalmente estaba la plataforma.

7.5. Las muestras biológicas

Al final de los tratamientos, los animales fueron pesados y anestesiados con zoletil (20 mg/kg, i.m.) y xilacina (5 mg/kg, i.m.). Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, se colocaron en tubos sin anticoagulante y se centrifugaron a 1 500 x g durante 15 min (Sorvall Legend Mach 1.6 R centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Los sueros se almacenaron a -70 °C y se descongelaron inmediatamente antes de su uso. Se extrajo el cerebro, se disecó el hipocampo y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su uso.

7.6. Análisis de los marcadores metabólicos

Las determinaciones en suero de marcadores metabólicos como la glucosa (GLU), el colesterol total (CT), los triacilgliceroles (TG), las lipoproteínas de alta densidad (C-

HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se realizaron con un analizador automatizado SPOTCHEM EZ SP-4430 (ARKRAY, Inc., Miami, Florida, USA) mediante el uso de tiras reactivas multiparamétricas siguiendo las indicaciones del fabricante. Los ácidos grasos libres (FFA) se cuantificaron utilizando un kit colorimétrico (BioVision, Milpitas, California, USA) y la absorbancia se midió a 570 nm de longitud de onda, el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones de uso.

7.7. Determinación de las citocinas proinflamatorias y la insulina

Los niveles de la IL-6, el TNF- α y la insulina se cuantificaron a través de un ensayo inmunoenzimático adsorbente en fase sólida (ELISA) mediante los kits comerciales; EZRTNFA rat (rat TNF- α elisa kit cat 900-k86, USA), Peprotech (Rat IL-6 Standard ABTS ELISA Development Kit, USA) y Millipore (Rat / Mouse Insulin Assay cat EZRMI-13K, USA) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 450 nm de longitud de onda, utilizando un lector de placas de microtitulación (LabSystems Multiskan EX lector de microplacas de 96 pocillos, Helsinki, Finlandia). Se consideraron aceptables los coeficientes de variación intraensayo inferiores al 7 %. Se generó una curva estándar para cada ensayo. Para determinar la resistencia a la insulina, se calculó el HOMA-IR mediante la siguiente fórmula: $([\text{insulina } \mu\text{UI/mL}] \times [\text{glucosa mg/dL}]) / 405$. En esta fórmula, el número 405 es un factor de normalización establecido para ajustar las unidades de glucosa y de insulina para proporcionar una medida más precisa de la resistencia a la insulina.

7.8. Determinación de la lipoperoxidación en el suero y el hipocampo

La lipoperoxidación se cuantificó en homogeneizados de hipocampo (en PBS 0.1 M, pH 7.5) y en suero mediante sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Jentzsch et al., 1996). Una alícuota de suero y homogeneizado de hipocampo fueron agregadas a tubos Eppendorf de 1.5 mL y las mezclas se mantuvieron en hielo, y luego se centrifugaron a 20 000 x g a 4 °C durante 15 min (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Alemania). Los sobrenadantes fueron separados en tubos y se les añadió ácido tiobarbitúrico (0.11 mM), se agitaron en vórtex y se calentaron a 90 °C durante 60 min, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó butanol, se agitaron en vórtex y se centrifugaron. Los sobrenadantes fueron transferidos a una placa de 96 pozos y la absorbancia fue leída a 535 nm de longitud de onda. Se preparó un patrón de referencia con 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

7.9. Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH) en el suero y el hipocampo

Se homogeneizaron fracciones de hipocampo (10 % p/v) en ácido metafosfórico al 5 % para determinar las concentraciones de glutatión reducido (GSH). Los homogeneizados fueron centrifugados a 20 000 x g a 4 °C durante 20 min (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Germany) y se colectaron los sobrenadantes. El GSH en el suero y los sobrenadantes se determinó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Ellman [5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), DTNB]. Este ensayo se basa en la reacción estequiométrica entre el DTNB y el grupo tiol del GSH. El producto, benzoato de nitromercapto, origina un color amarillo proporcional a la concentración

de GSH y es medible a una absorbancia máxima a 412 nm de longitud de onda (Tietze, 1969).

7.10. Determinación de glutatión oxidado (GSSG) en el suero y el hipocampo

Muestras de hipocampo se homogeneizaron (10 % p/v) en PBS 0.1 M pH 7.5, se centrifugaron a 10 000 x *g* a 4 °C durante 20 min (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Alemania) y los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones. Para la evaluación de la GSSG, se utilizó un método enzimático después del tratamiento del sobrenadante y el suero con 10 mM de 1-metil-2-vinilpiridio trifluorometanosulfonato, que secuestra los grupos tiol sin interferir con la enzima glutatión reductasa (GR) presente en el ensayo. El GSSG fue reducido a GSH por la GR en presencia de NADPH+ y el GSH generado se cuantificó utilizando el reactivo de Ellman. El producto es medible a una absorbancia máxima de 412 nm de longitud de onda (Tietze, 1969).

7.11. Determinación de las proteínas carboniladas en el suero y el hipocampo

Los grupos carbonilos fueron analizados espectrofotométricamente (Levine et al., 1990; modificado). El ensayo se basa en la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y los carbonilos proteicos formando una base de Schiff para producir la hidrazona correspondiente, que se lee a 370 nm de longitud de onda. Para ello, fueron preparados homogeneizados de hipocampo en PBS 0.1 M conteniendo 1 mM de EDTA a pH 6.7 y centrifugados a 10 000 x *g* durante 10 min a 4 °C (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Alemania). Se eliminaron los sobrenadantes y los pelets se

resuspendieron en PBS. Se transfirieron alícuotas de suero o de los botones resuspendidos a 2 tubos: uno se consideró tubo de muestra y el otro tubo de control, en los que se añadió DNPH en HCl 2.5 M o HCl 2.5 M respectivamente. Los tubos se dejaron incubar en la oscuridad durante 1 h. A continuación, se añadió ácido tricloroacético (TCA al 20 % p/v) a cada tubo, y las muestras se agitaron en vórtex, se incubaron a 4 °C durante 15 min y se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se repitió el paso utilizando TCA al 10 % (p/v). A continuación, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó (3 veces) con etanol/acetato de etilo (1/1; v/v) para eliminar el reactivo DNPH libre. Los pellets se resuspendieron en clorhidrato de guanidina 6 M, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 min a 4 °C. Por último, se leyeron las alícuotas del sobrenadante de los tubos de control y de muestra a 370 nm de longitud de onda.

Los resultados se reportaron de la siguiente manera:

$$\text{Proteínas carboniladas (nmol/mL)} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia control}}{\varepsilon} (A/B)$$

donde ε = Coeficiente de extinción para DNPH (0.011 μM^{-1}) se ajustó a la longitud de la solución en el pocillo; A= Volumen final de reacción; y B= Volumen leído en el pocillo.

7.12. Determinación de la capacidad antioxidante en el suero y el hipocampo

La capacidad antioxidante se determinó mediante el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Brand-Williams et al., 1995). Para ello, se disolvió 0.1 mM de DPPH en metanol al 80 % (DPPH-metanol). Las alícuotas de suero y los homogeneizados

de hipocampo en PBS (10 % p/v) se hicieron reaccionar con la solución de DPPH-metanol (1:29), se agitaron en vórtex y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad, a continuación, se centrifugaron a 9 000 x g durante 10 min a 4 °C (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Alemania). Una alícuota del sobrenadante se leyó en un lector ELISA a 517 nm de longitud de onda. Los resultados se expresaron como el porcentaje de eliminación del radical DPPH y se calculó de la siguiente forma.

$$\% \text{ eliminación de DPPH} = \frac{A0 - (A1 - A2)}{A0} \times 100$$

donde A0=control negativo (DPPH-metanol); A1=sistema que contiene la muestra (DPPH-metanol más suero/homogenado hipocampal); y A2=blanco (muestra-metanol).

7.13. Ensayo de actividad específica de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE)

Los fragmentos de hipocampo se homogeneizaron (10 % p/v) en Tris-hidrocloreuro 15 mM (conteniendo NaCl 1 M, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM y EDTA 3 mM), pH 7.5 al 1 % Brij-97 (p/v) un surfactante no iónico utilizado para solubilizar a las ChEs, ancladas a la membrana celular. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 20 000 x g a 4 °C durante 15 min (Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Alemania) y los sobrenadantes fueron separados para medir las actividades. Las actividades de BChE y AChE se determinaron por el método de Ellman (Ellman et al., 1961). Alícuotas de suero o sobrenadante se pretrataron con inhibidores específicos de

cada enzima (isoOMPA 2 mM y BW284C51 4 mM, respectivamente) en PBS 0.1 M con DTNB 0.01 M durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se añadieron tioanálogos de los sustratos naturales de BChE y AChE (butiriltilocolina 11 mM y acetiltilocolina 11 mM, respectivamente). El DTNB oxidó los grupos tiol libres, produciendo 5-tio-2-nitrobenzoato, que produjo un color amarillo que se leyó a 412 nm de longitud de onda. La actividad fue expresada como U/mg de proteína, donde una unidad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1.0 μ mol de sustrato por minuto. La cuantificación de proteínas se midió mediante el método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951).

7.14. Inhibición in vitro de la actividad de AChE por la NAM

Considerando la acción de la AChE en la hidrólisis de la ACh, se decidió estudiar únicamente el efecto *in vitro* de la NAM sobre esta enzima. Se utilizaron homogenados de hipocampo de ratas CONTROL para determinar la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) a diferentes concentraciones del sustrato (50-1000 μ M de acetiltilocolina). Posteriormente, para determinar el tipo de inhibición, se midió la actividad AChE con diferentes concentraciones del sustrato en presencia de diferentes concentraciones de la NAM (2.5-15 mM), evaluando el tipo de inhibición mediante el diagrama de Lineweaver-Burk ($1/[S]$ vs. $1/V_{max}$). El homogeneizado y la evaluación de la actividad enzimática se llevaron a cabo como se ha mencionado anteriormente.

7.15. Ensayo de permeabilidad en la BBB

Una vez finalizados los tratamientos, todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (25 mg/kg, i.p.). Se realizó una incisión torácica en el lado izquierdo de cada animal para exponer el corazón y se administraron 2 mL/kg de peso corporal de un cóctel de Na-fluoresceína (NaF; 10 mg/mL) y azul de Evans (AE; 1 mg/mL). Después de 5 min de circulación del coctel de trazadores, las ratas fueron perfundidas vía intracardiaca con solución salina (0.9 % p/v) durante 5 min. Posteriormente, el cerebro fue removido y el hipocampo fue extraído para evaluar los trazadores filtrados. Las muestras se homogeneizaron en PBS 0.1 M y se centrifugaron a 16, 000 x *g* durante 10 min. Después, se añadió metanol anhidro al sobrenadante, se agitó en vórtex y se centrifugó a 16, 000 x *g* durante 10 minutos. Los sobrenadantes se colocaron en una placa de 96 pocillos y la absorbancia se cuantificó mediante un lector de microplacas HLAB (H Reader 1) utilizando filtros de excitación de 485 nm y emisión de 535 nm para NaF y filtros de excitación de 535 nm y emisión de 595 nm para AE. El análisis fue por duplicado y la concentración de los trazadores se calculó por una curva estándar. Los resultados se presentan como la concentración del trazador por peso de tejido húmedo del hipocampo (mg/g) (Figura 3).

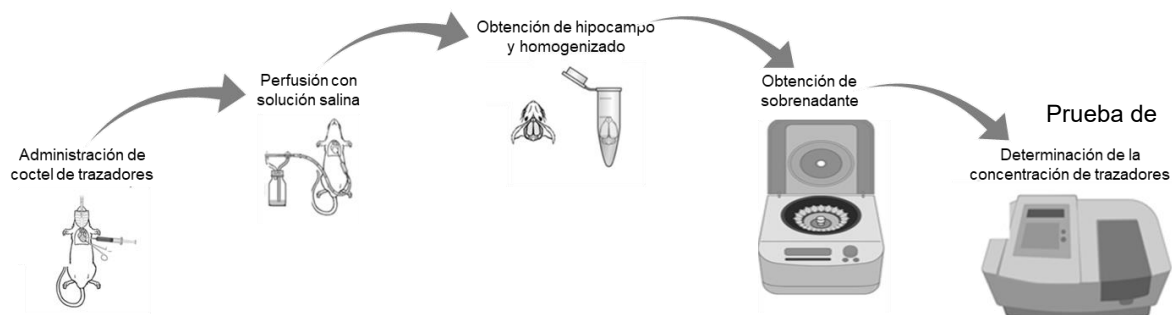


Figure 3. Determinación de la permeabilidad de la BBB en hipocampo. La prueba consistió en la administración vía intracardiaca de un coctel de trazadores de bajo peso molecular (NaF y AE) impermeables a la BBB en condiciones normales. Se perfundió con solución salina y se extrajo el hipocampo, se homogeneizó y finalmente se separó el sobrenadante y mediante un espectrofotómetro se determinaron las concentraciones de los trazadores que cruzaron la BBB.

7.16. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron con ANOVA de una vía, y se utilizó la prueba de Tukey para los análisis post hoc entre grupos. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8, y los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

8. Resultados

8.1. La administración de la NAM reduce el tejido adiposo y aumenta la masa muscular

La dieta HFS disminuyó la ingesta de alimentos y líquidos; sin embargo, las calorías consumidas fueron aproximadamente al doble, sin cambios en el peso corporal en comparación con las del grupo CONTROL. Además, el grupo HFS mostró un aumento significativo del tejido adiposo visceral y epididimario (190 % y 149 %, respectivamente), junto con una disminución significativa de la masa muscular del cuádriceps (39.8 %), en comparación con los del grupo CONTROL. En los grupos HFS-NAM5, 10 y 15 se observó una disminución significativa del tejido adiposo visceral (61 %, 29 % y 22 % respectivamente) y epididimario (60 %, 33 % y 31 % respectivamente), así como un aumento de la masa muscular del cuádriceps (58 %,

28 % y 28 % respectivamente), en comparación con los del grupo HFS, con valores similares a los del grupo CONTROL. Estos cambios también se observaron en los grupos NAM 10 y NAM 15 en comparación con el grupo HFS, pero sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de NAM sobre el peso corporal, tejido adiposo y masa muscular en ratas alimentadas con una dieta HFS

PARÁMETROS	CONTROL	HFS	HFS-NAM5	HFS-NAM10	HFS-NAM15
Peso inicial (g)	248 ± 1.3	252 ± 1.3	250 ± 0.8	248 ± 1.0	250 ± 1.1
Peso final (g)	436 ± 5.4	446 ± 14	398 ± 13	436 ± 19.3	444 ± 13
Ganancia de peso (g)	188 ± 5.9	195 ± 13.9	148 ± 13	186 ± 19.3	194 ± 12.6
Calorías (Kcal/week)	533 ± 13.1	850 ± 27.1***	892 ± 36.4	878 ± 25.2	909 ± 45.1
Tejido adiposo visceral (g)	4.27 ± 0.4	12.4 ± 1.1***	4.8 ± 0.8&&&	8.8 ± 1.4&	9.7 ± 0.8&
Tejido adiposo epidídimo (g)	2.55 ± 0.5	6.3 ± 0.7***	2.5 ± 0.5&&&	4.2 ± 0.5&	4.3 ± 0.4&
Masa muscular cuádriceps (g)	5.93 ± 0.5	3.6 ± 0.2**	5.7 ± 0.3&&	4.6 ± 0.5&	4.6 ± 0.3&

Los valores se expresan como la media ± SEM de 8 animales por grupo. **p < 0.01, ***p < 0.001 con respecto al grupo CONTROL y &&p < 0.01 y &&&p < 0.001 con respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

8.2. La administración de la NAM mejora el perfil metabólico y las citocinas proinflamatorias

Los resultados en la Tabla 2, muestran los aumentos significativos y pronunciados en los niveles séricos de glucosa (50 %), insulina (29 %), CT (12%), TG (68 %), FFA (503 %) y HOMA-IR (96 %) en el grupo HFS en comparación con los del grupo CONTROL. El grupo HFS mostró una reducción del 35 % de C-HDL en comparación con el grupo CONTROL. Por el contrario, los grupos HFS-NAM5, HFS-NAM10 y HFS-NAM15 presentaron niveles disminuidos en la glucosa (37 % 29 % y 20 % respectivamente), TG (63 %, 51 % y 26 % respectivamente) y TC (10 %, 13 % y 14

% respectivamente), así como un aumento en los niveles de C-HDL (46 %, 42 % y 28 % respectivamente) comparados con el grupo HFS. Las tres dosis de NAM (5, 10 y 15 mM) disminuyeron significativamente los niveles séricos de FFA (81 %, 305 % y 71 %, respectivamente), en la insulina (12 %, 20 % y 24 % respectivamente) y HOMA-IR (46 %, 41 % y 38 % respectivamente) en comparación al grupo HFS.

Por otro lado, la dieta HFS aumentó significativamente el TNF- α (44.3 %) y la IL-6 (451 %) con respecto al grupo CONTROL. Los grupos HFS-NAM5, HFS-NAM10 y HFS-NAM15 presentaron un decremento de IL-6 (86 %, 71 % y 55 % respectivamente) en comparación con el grupo HFS (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de NAM sobre los parámetros bioquímicos y de inflamación en suero de ratas alimentadas con una dieta HFS

PARÁMETROS	CONTROL	HFS	HFS-NAM5	HFS-NAM10	HFS-NAM15
Marcadores Bioquímicos					
Glucosa (mg/dL)	83.3 $\pm$ 4.8	125 $\pm$ 4.7***	78.8 $\pm$ 5.4&&&	88.8 $\pm$ 5.2&&&	100 $\pm$ 2.6&
Insulina (μUI/mL)	13.7 $\pm$ 0.09	17.7 $\pm$ 0.24*	15.8 $\pm$ 0.60&	14.02 $\pm$ 1.21&	13.4 $\pm$ 1.06&
TC (mg/dL)	64.0 $\pm$ 2.8	71.5 $\pm$ 2.5&	64.5 $\pm$ 1.6&	62.0 $\pm$ 1.4&	60.0 $\pm$ 4.5&
TG (mg/dL)	66.3 $\pm$ 13.7	112 $\pm$ 9.8*	41.3 $\pm$ 2.3&&&	54.8 $\pm$ 10.5&&	82.8 $\pm$ 10.4&
C-HDL (mg/dL)	41.8 $\pm$ 3.4	27.2 $\pm$ 2.9**	39.8 $\pm$ 1.4&	38.8 $\pm$ 1.5&	35 $\pm$ 3.0&
C-LDL (mg/dL)	11.3 $\pm$ 1.9	15.3 $\pm$ 2.3	14.5 $\pm$ 1.3	9 $\pm$ 2.8	8 $\pm$ 2.4
FFA (nmol/uL)	10.4 $\pm$ 1.3	60.3 $\pm$ 20.9*	11.5 $\pm$ 3.5&&	17.4 $\pm$ 6.5&	10.4 $\pm$ 1.9&&
HOMA-IR	2.7 $\pm$ 0.17	5.3 $\pm$ 0.22***	2.8 $\pm$ 0.22&&&	3.1 $\pm$ 0.47&&	3.2 $\pm$ 0.31&&
Biomarcadores inflamación					
TNF-α (pg/mL)	4.8 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.2*	7.1 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.4
IL-6 (pg/mL)	2.5 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.8***	2.0 $\pm$ 0.4&&&	4.1 $\pm$ 1.4&&	6.4 $\pm$ 2.9&

Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de 8 animales por grupo. *p<0.05, **p<0.001 y ***p<0.001 respecto al grupo CONTROL y &p<0.05, &&p<0.01 y &&&p<0.001 respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey. GLU: glucosa, CT: colesterol total, TG: triacilglicerol, C-HDL: colesterol-lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol-lipoproteínas de baja densidad, FFA: ácidos grasos libres, HOMA-IR; resistencia a la insulina, TNF- α : factor de necrosis tumoral α , IL-6: interleucina 6.

8.3. La administración de la NAM reduce en suero la lipoperoxidación, proteínas carboniladas y la actividad de las ChEs, aumentando la capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG

En el suero, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas aumentaron significativamente en el grupo HFS (64 %; Figura 4A y 48 %; Figura 4B, respectivamente) junto con la actividad AChE y BChE (~58 %, Figura 4E y 4F) en comparación con los del grupo CONTROL. Además, la capacidad antioxidante y el estado redox, evaluados mediante DPPH y la relación GSH/GSSG disminuyeron (23.5 %; Figura 4C y 52 %; Figura 4D, respectivamente) en el grupo HFS, comparado con el grupo CONTROL. Por el contrario, los grupos HFS-NAM 5, 10 y 15 mM disminuyeron la lipoperoxidación (43 %, 65 % y 29 %, respectivamente), proteínas carboniladas (37 %), la actividad de AChE (25 %, 33 % y 34 %, respectivamente) y la actividad de BChE (60 %, 28 % y 40 %, respectivamente) en comparación con el grupo HFS. Además, los grupos HFS-NAM5, 10 y 15 mostraron una mayor capacidad para eliminar el radical DPPH (~39 %) y tenían una mayor relación GSH/GSSG (104 %, 159 % y 93 %, respectivamente) en comparación con el grupo HFS.

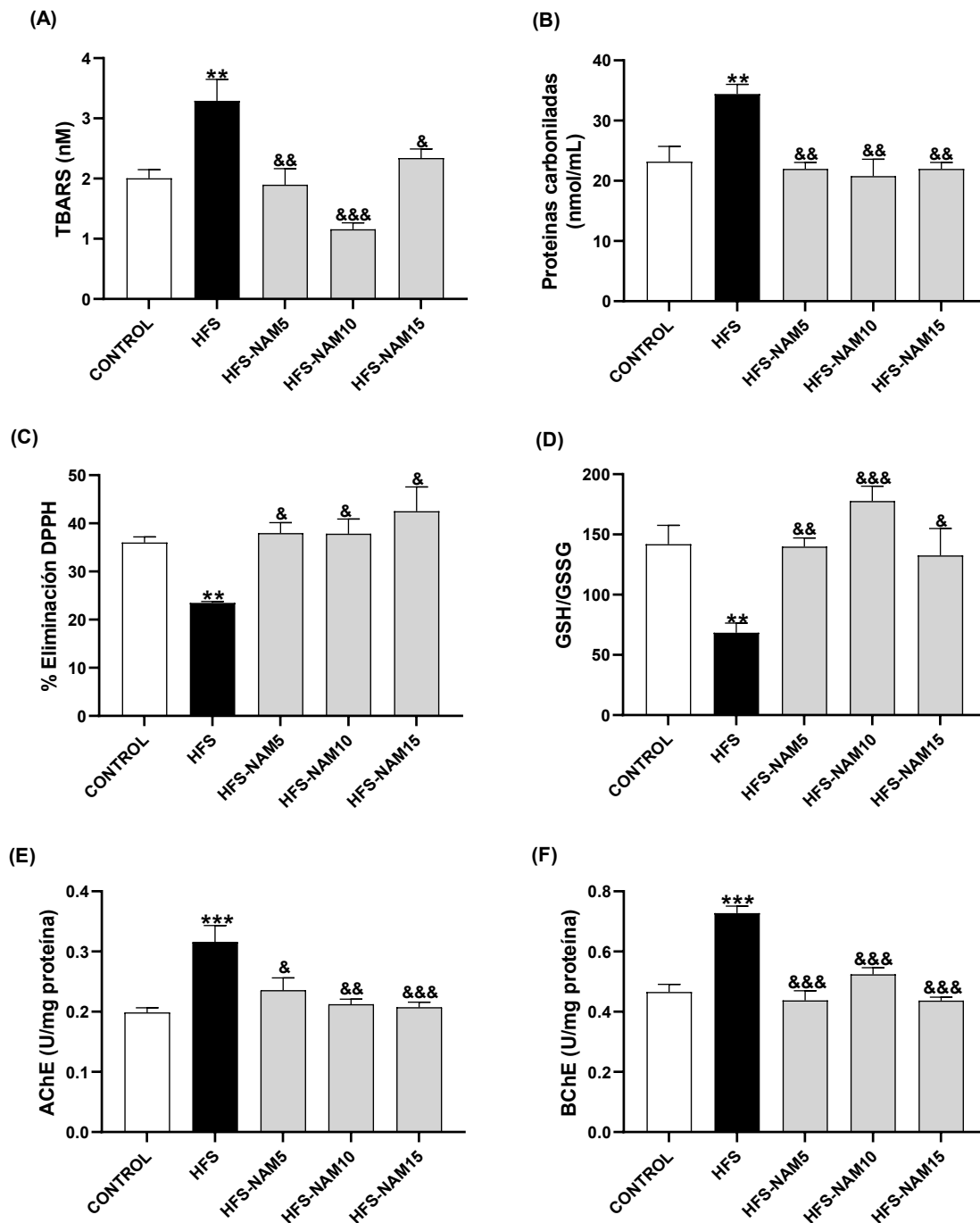


Figura 4. Efecto de NAM en marcadores de estrés oxidativo y actividades de las ChEs en suero de ratas alimentadas con una dieta HFS. (A) Concentraciones de TBARS. (B) Proteínas carboniladas. (C) % de eliminación de DPPH. (D) Relación GSH/GSSG. (E) Actividad específica de AChE. (F) Actividad específica de BChE. Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de 8 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo CONTROL y & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

8.4. La administración de la NAM reduce la lipoperoxidación, proteínas carboniladas y la actividad de las ChEs, aumentando la capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG en el hipocampo

En el hipocampo, el grupo HFS mostró resultados similares a los observados en el suero, donde aumentaron las TBARS y las proteínas carboniladas (47 %; Figura 5A, 166 %; 5B, respectivamente), las actividades de AChE (64 %; Figura 5E) y BChE (300 %; Figura 5F), mientras que la capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG disminuyeron (20 %; Figura 5C y 58 %; Figura 5D, respectivamente) en comparación con el grupo CONTROL. NAM ejerció un efecto antioxidante al disminuir significativamente en las TBARS en los grupos HFS-NAM5, 10, y 15 (40 %, 29 %, y 31 %, respectivamente) simultáneo con un aumento en la relación GSH/GSSG (62 %, 185 %, y 81 %, respectivamente) y la capacidad antioxidante (26 %, 34 %, y 33 %, respectivamente) en comparación con el grupo HFS. También, se observó que disminuyeron significativamente las proteínas carboniladas en el hipocampo de los grupos HFS-NAM10 y 15 (40 % y 60 %, respectivamente). En el caso de la actividad de las ChEs en hipocampo, NAM disminuyó la actividad de AChE un ~29 % y mostró una disminución pronunciada del 70 % en la actividad de BChE en comparación con el grupo HFS, con valores cercanos a los obtenidos en el grupo CONTROL.

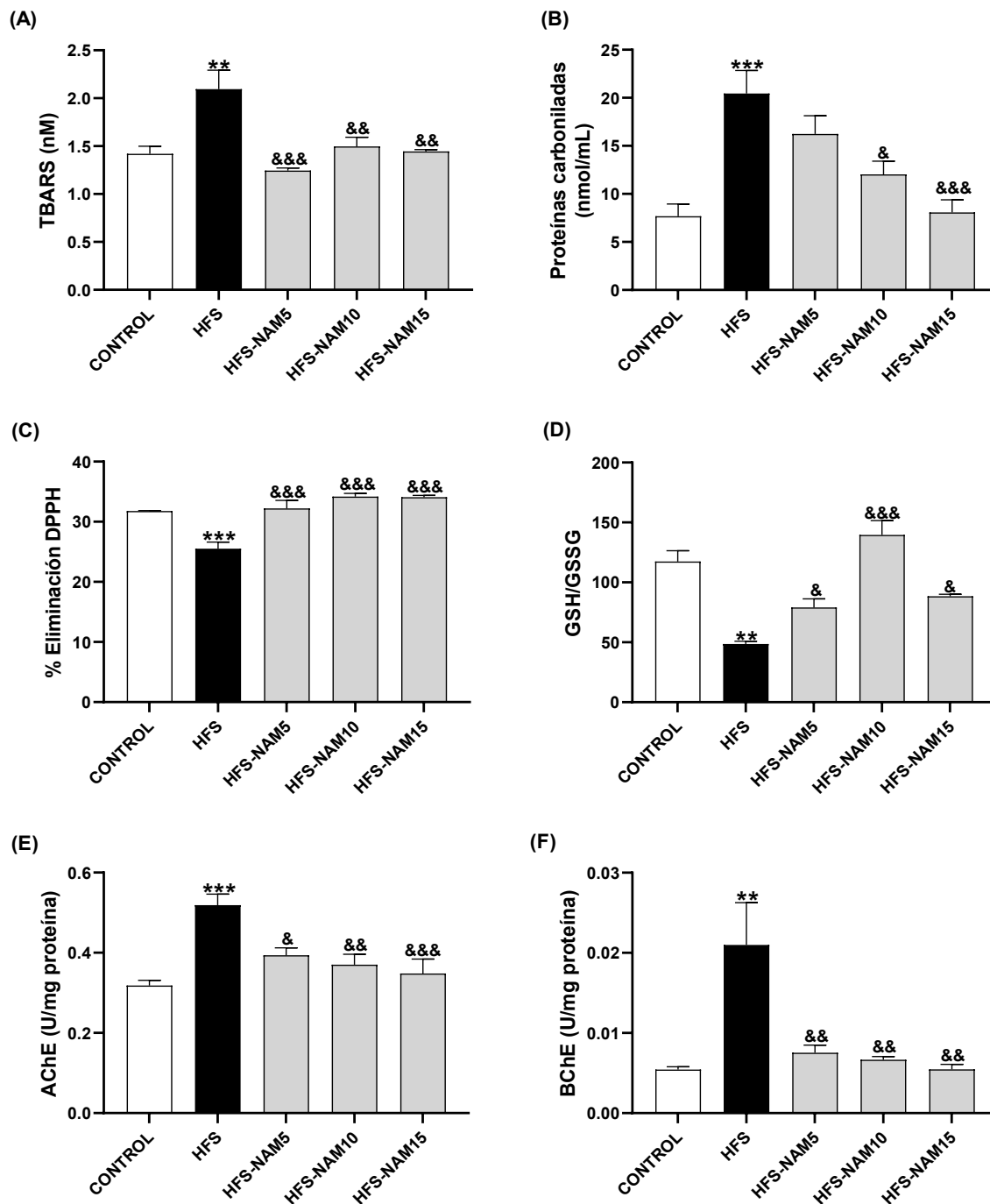


Figura 5. Efecto de NAM en marcadores de estrés oxidativo y actividades de las ChEs en hipocampo de ratas alimentadas con una dieta HFS. (A) Concentraciones de TBARS. (B) Proteínas carboniladas. (C) % de eliminación de DPPH. (D) Relación GSH/GSSG. (E) Actividad específica de AChE. (F) Actividad específica de BChE. Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de 8 animales por grupo. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo CONTROL y & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

8.5. La administración de la NAM disminuye la permeabilidad de la BBB en el hipocampo

Se evaluó la permeabilidad de la BBB con 2 trazadores que no pasan en una barrera íntegra: Evans (AE) y fluoresceína sódica (NaF). El grupo HFS presentó el mayor aumento en la extravasación de los trazadores (5.34 veces; Figura 6A y 7 veces; Figura 6B, respectivamente) en comparación con el grupo CONTROL. Por el contrario, NAM disminuyó significativamente la permeabilidad de la BBB; se observó una menor extravasación de AE en el grupo HFS-NAM5 (2.6 veces) y en el grupo HFS-NAM10 (1 vez) en comparación con el grupo HFS (Figura 6A). En los grupos HFS-NAM5, 10 y 15 mM, la extravasación de NaF disminuyó significativamente (~1,5 veces) en comparación con el grupo HFS (Figura 6B).

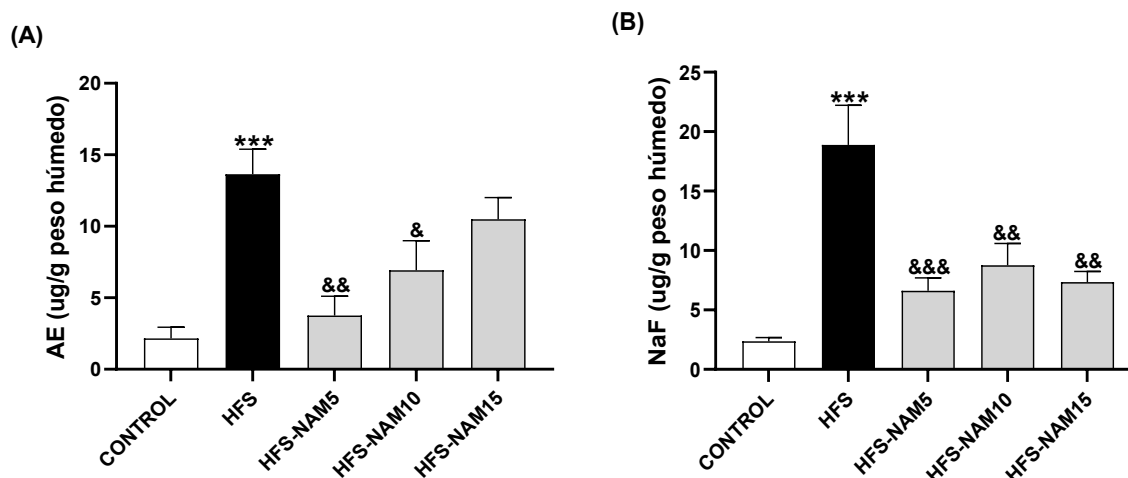


Figura 6. Efecto de NAM sobre la permeabilidad de la BBB en hipocampo en ratas alimentadas con dieta HFS. (A) Permeabilidad AE (Azul de Evans). (B) Permeabilidad NaF (fluoresceína sódica). Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de 5 animales por grupo. *** $p < 0.001$ respecto al grupo CONTROL y & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

8.6. La administración de la NAM atenúa el deterioro cognitivo inducido por la sobrecarga calórica

La capacidad cognitiva en ratas se evaluó mediante la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM) tras 12 semanas de administración de la dieta HFS. Durante la prueba se evaluó el aprendizaje (latencia) y la memoria (retención). Durante la fase de entrenamiento, el grupo CONTROL presentó una disminución constante de la latencia a lo largo de los 5 días; mientras tanto, el grupo HFS mostró un deterioro en el aprendizaje en los días 2, 3, 4 y 5, como lo demuestran las latencias más altas para encontrar la plataforma oculta (1, 2.5, 1.5 y 2.7 veces, respectivamente, Figura 7A y 7B), con respecto al grupo CONTROL. En las dosis utilizadas, la NAM revirtió el déficit cognitivo inducido por la dieta HFS, como lo demuestra una reducción progresiva de las latencias del día 2 al día 5 (~0.71, 1.6, 0.75 y 1 veces, respectivamente; Figura 7A y 7B) en comparación con los del grupo HFS.

La prueba de retención se realizó 48 h después de la última sesión de entrenamiento, para la cual primero se retiró la plataforma. Las ratas del grupo HFS pasaron menos tiempo en el cuadrante donde se había situado la plataforma (0.6 veces menos; Figura 7C) que las del grupo CONTROL. Por otra parte, las ratas de los grupos HFS-NAM5, 10 y 15 nadaron más tiempo en el cuadrante donde se había situado la plataforma (0.6, 0.6 y 1 vez, respectivamente; Figura 7C) con respecto al grupo HFS.

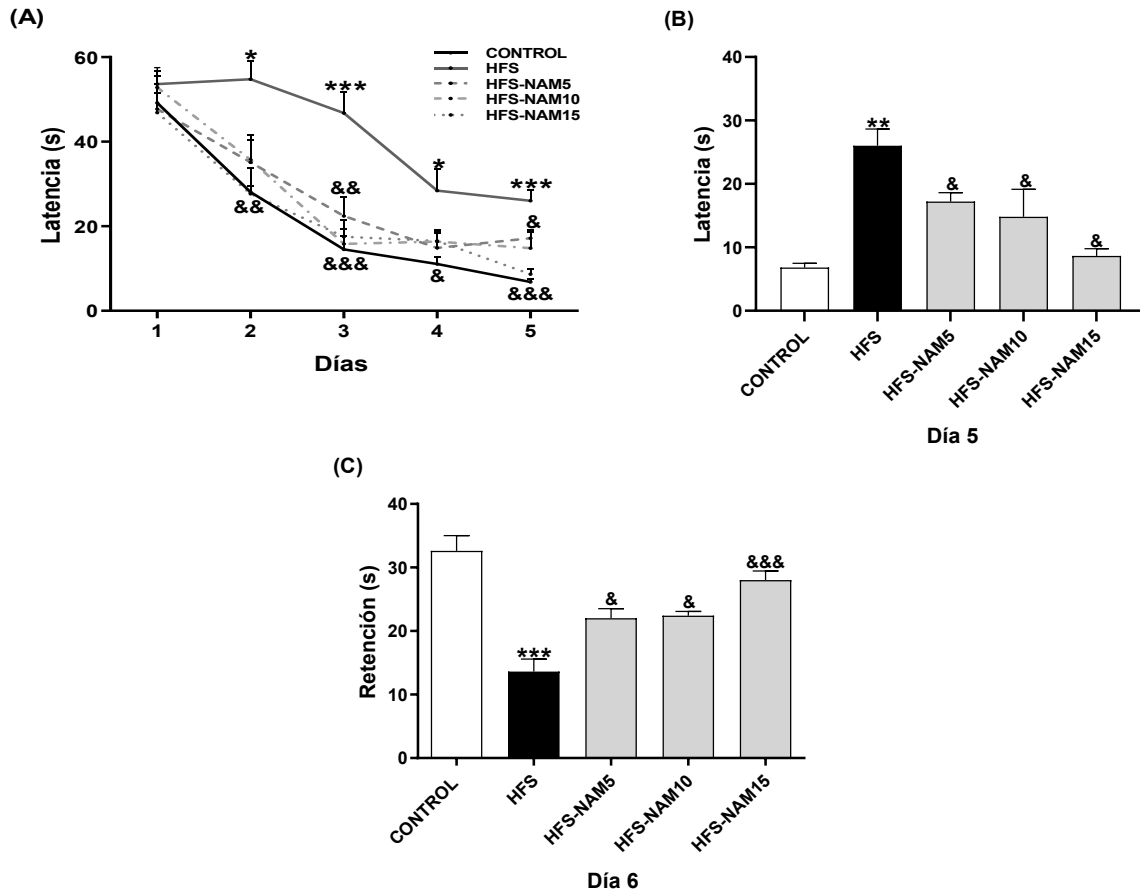


Figura 7. NAM aumenta el aprendizaje y la memoria espacial en ratas alimentadas con dieta HFS. (A) Latencia (aprendizaje) los días 1-5. (B) Latencia día 5. (C) Tiempo nadando en el cuadrante donde estaba situada la plataforma, prueba de retención, día 6 (memoria). Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de 8 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo CONTROL y & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ respecto al grupo HFS. Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey.

8.7. La NAM es un inhibidor acompetitivo de la actividad AChE

En la cinética de Michaelis-Menten se observó un decremento de la V_{max} en la actividad de la AChE dependiente de la concentración de la NAM (Figura 8A), lo que indica un efecto inhibitor de la NAM. Este hallazgo fue confirmado por los valores de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) evaluados mediante el diagrama de Lineweaver-Burk (Figura 8B), mostrando que la K_m y la V_{max} disminuyeron (V_{max} :

[0];0.62, [2.5];0.58, [5];0.54,[10];0.51, [15];0.45 y K_m [S]: [0];0.16, [2.5];0.13, [5];0.11, [10];0.12, [15];0.11) desde la concentración más baja de NAM (2,5 mM) hasta la más alta (15 mM) con respecto al grupo sin NAM (CONTROL), indicando una inhibición de tipo acompetitiva, en la cual el inhibidor se une solo al complejo enzima sustrato alterando la actividad catalítica de la enzima.

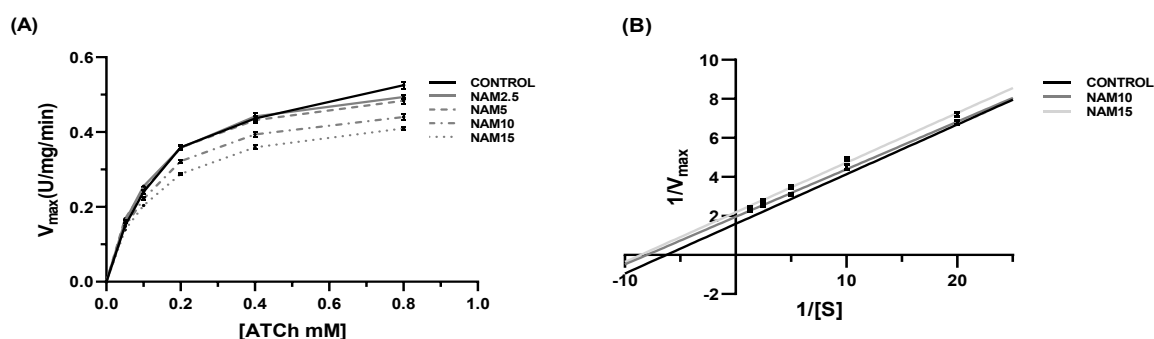


Figura 8. Inhibición *in vitro* de AChE por NAM en hipocampo de rata. (A) Diagrama de Michaelis-Menten para la actividad de AChE a diferentes concentraciones del sustrato acetiltiocolina (ATCh 0.05-0.8 mM) y NAM (2.5-15 mM). (B) Diagrama de Lineweaver-Burk para la actividad de AChE a diferentes concentraciones de NAM (10 y 15 mM) muestra inhibición acompetitiva. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al CONTROL (sin NAM). Análisis de ANOVA de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. V_{max} ; velocidad máxima, K_m ; constante de Michaelis-Menten, [S]; concentración de sustrato.

9. Discusión

En el presente estudio encontramos que la glucolipotoxicidad generada por la dieta hipercalórica alteró los parámetros bioquímicos, los de inflamación, el estrés oxidante, además, causó un aumento en la permeabilidad de la BBB, la actividad de las ChEs y afectó la capacidad cognitiva. La administración a largo plazo de NAM atenuó todas estas alteraciones. La NAM mejoró la sensibilidad a la insulina, la

capacidad antioxidante y la integridad de la BBB, al mismo tiempo disminuyó el estrés oxidante, la lipoperoxidación y la actividad de las ChEs, mejorando la capacidad cognitiva (el aprendizaje y memoria espacial).

La ingesta de dietas con elevado contenido energético propicia alteraciones tanto periféricas como en el SNC, afectando la calidad de vida y aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas (Walker & Harrison, 2015; Gutiérrez-Solis et al., 2023). Estas alteraciones inician como consecuencia de la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo y en tejidos no especializados (almacenamiento ectópico), lo que induce una hipertrofia en los adipocitos, así como la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias. Además, los ácidos grasos libres (FFA) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas en el tejido adiposo circulan a través de la sangre y alcanzan diferentes órganos y tejidos, afectando su función (Biobaku et al., 2019). Esta circulación sistémica de productos del tejido adiposo contribuye a la disfunción metabólica y al desarrollo de enfermedades relacionadas con la obesidad.

En este sentido, nuestro modelo de dieta hipercalórica condujo a un aumento de la grasa visceral y epididimal, reflejando un aumento de los niveles circulantes de FFA, TG, TC, IL-6 y TNF- α en el grupo HFS que puede ser consecuencia de un efecto combinado sobre el hígado, la adiposidad y la resistencia a la insulina (Tabla 2). La respuesta a la HFS puede comenzar cuando la fructosa derivada de la sacarosa promueve la síntesis hepática de ácidos grasos y la subsiguiente formación de TG, induciendo resistencia hepática a la insulina (Mejía et al., 2018; Loza-Medrano et al., 2020; Villeda-González et al., 2020), como se evidenció por el HOMA-IR en el grupo

HFS. Además, los FFA séricos generados por la lipólisis, promovieron la lipoperoxidación y un ambiente oxidante en el grupo HFS, evidenciado por el aumento en las TBARS y la disminución de la capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG. Los niveles disminuidos de la relación GSH/GSSG sugieren un estado redox oxidado y la incapacidad para contrarrestar los efectos perjudiciales o la alta producción de ERO. Además, el aumento de TBARS, de proteínas carboniladas y la disminución de la capacidad antioxidante (DPPH) indican una posible toxicidad celular.

El consumo de dietas hipercalóricas, además de generar cambios metabólicos, también se asocia con alteraciones en la permeabilidad de la BBB y déficit cognitivo (Pallebage-Gamarallage et al., 2012; Lin et al., 2017). El aumento del estrés oxidante, la inflamación sistémica y los niveles de FFA saturados circulantes afectan a la integridad de la BBB, desencadenando neuroinflamación y subsecuentemente deterioro cognitivo (Pugazhenthir et al., 2017; Rhea et al., 2017). En nuestra investigación, el aumento en IL-6, TNF- α , TBARS y FFA en suero de los animales del grupo HFS se puede asociar con el déficit cognitivo, como lo indica la memoria y aprendizaje espacial deficientes durante las fases de entrenamiento y retención de la prueba del laberinto acuático de Morris. Las TBARS, en particular el 4-hidroxi-nonenal y el malondialdehído, son subproductos de la oxidación lipídica debido a un aumento de los radicales libres. Los niveles elevados de ERO en el SNC son uno de los principales determinantes de la disfunción cognitiva (Roy et al., 2021).

Además, la ingesta de una dieta alta en calorías produjo aumento en la permeabilidad de la BBB hipocampal, la concentración de las TBARS y las proteínas carboniladas, al tiempo que disminuyó la capacidad antioxidante y la relación GSH/GSSG. El aumento de la permeabilidad de la BBB sugiere el paso libre de iones y moléculas al parénquima cerebral (Ogata et al., 2019). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con el hallazgo de que las dietas hipercolesterolémicas o altas en grasas saturadas inducen disfunción en la BBB y desencadenan activación glial en el hipocampo y la corteza cerebral en roedores (D'Alonzo et al., 2020; Li et al., 2021). El estrés oxidante sistémico se demostró mediante los niveles altos de las proteínas carboniladas y las TBARS en suero, así como por la baja capacidad antioxidante (DPPH) y la disminución de la relación GSH/GSSG. En consecuencia, el estrés oxidante sistémico afecta a la integridad de la BBB, probablemente oxidando las proteínas de las uniones estrechas, aumentando la permeabilidad y provocando un aumento de citocinas proinflamatorias y los FFA en diferentes regiones cerebrales (Tucsek et al., 2014; Elahy et al., 2015). En este sentido, nuestros resultados indican que la dieta HFS aumentó el estrés oxidante y la inflamación en el hipocampo, afectando a la memoria y el aprendizaje. En condiciones normales, el tránsito de moléculas a través de la BBB se produce de forma selectiva por transportadores (Liu & Liu, 2014). Sin embargo, se ha descrito que la alteración de las uniones estrechas desencadena un paso descontrolado de metabolitos, que eventualmente pueden alterar la función de neuronas y células gliales (parénquima cerebral) en regiones como el hipocampo afectando la capacidad cognitiva (Ogata et al., 2019). La permeabilidad de la BBB en el hipocampo aumentó

en el grupo HFS, esto podría estar indicando alteraciones en los complejos proteicos que constituyen a las uniones estrechas, como se reportado un modelo in vitro con una dieta alta en grasas donde se observó que disminuyeron las expresiones de ZO-1 y la ocludina (Li et al., 2021). Estas alteraciones en la permeabilidad de barrera permiten la entrada de moléculas periféricas y células inmunes (citocinas, células inmunes) que perturban la homeostasis en parénquima cerebral (Erickson et al., 2012), afectando la función del hipocampo con relación a la memoria y aprendizaje, así demostrado mediante la prueba del MWM donde el grupo HFS presenta un bajo desempeño al tardar más tiempo en encontrar la plataforma (aprendizaje) y nadar menos tiempo en el cuadrante donde había estado posicionada la plataforma (memoria).

Por otra parte, se ha descrito previamente un aumento de la actividad de las ChEs séricas inducido por una dieta alta en carbohidratos (Villeda-González et al., 2020). Este aumento en la actividad colinesterásica probablemente provoca una mayor hidrólisis de la ACh, impidiendo su actividad anti-inflamatoria y favoreciendo la inflamación sistémica. Se ha descrito que la unión de la ACh al receptor nicotínico en macrófagos ejerce efectos anti-inflamatorios, evitando la producción y liberación de citocinas proinflamatorias (Shenhar-Tsarfaty et al., 2015). El mismo mecanismo puede darse en el SNC, ya que el receptor $\alpha 7$ nicotínico de la ACh se encuentra principalmente en los astrocitos y microglia (Aryal et al., 2021). La reducción de los niveles de la ACh exacerba la neuroinflamación y afecta la sinapsis colinérgica, favoreciendo el deterioro cognitivo (Gamage et al., 2020). El aumento de la actividad

de AChE y BChE en el hipocampo del grupo HFS puede inducir una disminución de los niveles de la ACh, lo que estaría favoreciendo el déficit cognitivo, así como a un aumento en la inflamación al no unirse a su $\alpha 7$ nAChR lo cual podría asociarse alteraciones en la permeabilidad de la BBB. Los cambios en la glicosilación de la ChEs pueden explicar su alta actividad en el grupo HFS. Las ChEs son glicoproteínas que sufren modificaciones postraduccionales (incorporación de carbohidratos) para llevar a cabo una función adecuada, y además son importantes para su vida media, como es el caso de AChE, la cual disminuye su vida media en la circulación asociada a la disminución de ácido siálico (desialización) (Nalivaeva & Turner, 2001). Informes anteriores han demostrado que una HFD conduce a una regulación positiva de las sialidasas que eliminan el ácido siálico de las glicoproteínas, incluidas la AChE y la BChE, induciendo inflamación y esteatosis (Pilling et al., 2021). La glicosilación adecuada de AChE en el cerebro también es importante, ya que en pacientes con la enfermedad de Alzheimer se han observado alteraciones en su patrón de glicosilación (Sáez-Valero et al., 1999). Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones podrían aumentar la actividad de estas enzimas y ampliar la vulnerabilidad de regiones que son importantes para el aprendizaje y la memoria, como hemos encontrado en este estudio.

Por otra parte, la administración de la NAM disminuyó la acumulación de tejido adiposo, los niveles de TG, TC, FFA, insulina e IL-6 en suero y mejoró la concentración de C-HDL y el metabolismo de la glucosa en ratas HFS. En el suero y

el hipocampo, la NAM reguló la actividad de las ChEs, la capacidad antioxidante (DPPH) y disminuyó las TBARS y las proteínas carboniladas en las ratas del grupo HFS. Además, la NAM disminuyó la permeabilidad de la BBB y aumentó la relación GSH/GSSG en el hipocampo de las ratas HFS. Al regular las alteraciones tanto en el suero como en el hipocampo, la NAM ejerció un efecto protector que atenuó el déficit cognitivo producido por el consumo de la dieta hipercalórica.

Debido a que la NAM es precursora de las coenzimas NAD^+ , NADH, NADP^+ y NADPH, se le ha considerado como un anti-inflamatorio y antioxidante, así como de relevancia en el metabolismo celular al promover la producción de ATP en aquellos trastornos que lo requieren como en la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson (Song et al., 2019). Además, la NAM tiene un efecto protector contra la obesidad inducida por la dieta al mejorar la eficiencia del gasto energético a través de su capacidad por aumentar los niveles de NAD^+ y la actividad mitocondrial en el tejido adiposo, lo que resulta en un aumento de la oxidación de ácidos grasos y una disminución del almacenamiento en el tejido adiposo, así como promover una mayor actividad de SIRT 3, aumentar la expresión de SOD2 y disminuir las ERO (Luo et al., 2022). Estas acciones de la NAM se traducen en la prevención de la esteatosis hepática y la reducción de la inflamación y la intolerancia a la glucosa (Mejía et al., 2018; Méndez-Lara et al., 2021). Además, en este estudio, la NAM impidió la pérdida de masa muscular en los cuádriceps de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica, lo que confirmó su efecto protector sobre la masa muscular. Por lo tanto, podría ser un tratamiento potencial para la atrofia muscular, ya que la NAM

disminuyó a los FFA, la inflamación y el estrés oxidante, previniendo la pérdida de proteínas musculares. Estudios previos han informado que la administración de la NAM reduce los niveles de glucosa, disminuye las ERO, induce la actividad de enzimas antioxidantes (Singh & Bodakhe, 2021) y regula la vía de la sirtuina, mejorando la biogénesis mitocondrial en ratas diabéticas tratadas con una HFD (Yang et al., 2014).

En nuestro estudio, la NAM disminuyó las concentraciones de IL-6 y la actividad de las ChEs en suero. El efecto anti-inflamatorio de la NAM se ejerce a través del aumento de las concentraciones de NAD^+ , que se utiliza como sustrato para un grupo de enzimas histonas desacetilasas conocidas como sirtuinas, provocando un aumento de su actividad e inhibiendo la formación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). Paralelamente, es posible que la reducción en la actividad de las ChEs por la NAM atenúe la hidrólisis de ACh, por tanto, el neurotransmisor se una al receptor nicotínico $\alpha 7$, y se lleve a cabo la vía colinérgica anti-inflamatoria evitando la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias (Pugazhenth et al., 2017).

Además, en el hipocampo el efecto antioxidante de NAM se demostró a través de la restauración de la relación GSH/GSSG, lo que previno el efecto deletéreo de las ERO en el metabolismo neuronal y la función cognitiva (Fricker et al., 2018), probablemente debido a la disponibilidad de NADPH mediada por la NAM, enzimas productoras de NADPH y la modulación de la homeostasis redox (Loza-Medrano et al., 2020). El NADPH se utiliza en el reciclaje de GSH a partir de GSSG por la enzima glutatión reductasa, lo que conduce a un aumento de la capacidad

antioxidante celular y reduce el estrés oxidante (Turunc Bayrakdar et al., 2014). Esta acción antioxidante se evidencia por las bajas concentraciones de las TBARS, la prevención de la oxidación de proteínas y la restauración de la relación GSH/GSSG en el suero y el hipocampo.

El estrés oxidante y las concentraciones de ATP bajas son las principales causas de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al déficit cognitivo (Vilela et al., 2023). El aumento del estrés oxidante se correlaciona con un aumento de la actividad de las ChEs, lo que contribuye a reducir las concentraciones de ACh y afecta a las sinapsis y los procesos cognitivos (Gao et al., 2022). En este sentido, se han utilizado diversas moléculas con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias para disminuir la actividad de las ChEs (Georgiev et al., 2011). Estos datos demuestran que la regulación del estrés oxidante es clave para el correcto funcionamiento de la vía colinérgica y la restauración de las sinapsis en el cerebro (Yamini et al., 2022).

Aunque inhibidores de las colinesterasas se utilizan actualmente como tratamiento en enfermedades como el Alzheimer para aumentar los niveles de ACh (Alhazmi & Albratty, 2022), no han sido completamente eficaces, ya que el estrés oxidante persiste en condiciones patológicas (Simunkova et al., 2019). En este contexto, se ha demostrado que la NAM ayuda a disminuir el estrés oxidante y puede regular la actividad de enzimas como las sirtuinas funcionando como un inhibidor no competitivo al acoplarse a un sitio que participa en la unión y catálisis de NAD^+ un sustrato indispensable para que las sirtuinas lleven a cabo su función (Avalos et al.,

2005). Resultados similares mostraron que moléculas derivadas de la NAM inhiben reversiblemente las actividades de AChE y BChE debido a que tienen una alta afinidad por su sitio activo (Zandona et al., 2020), hallazgo confirmado mediante estudios de acoplamiento molecular (Villeda-González et al., 2020).

Al reducir el estrés oxidante, la NAM podría estar disminuyendo de forma indirecta la actividad de las ChEs, sin embargo, para saber si podría estar regulando su actividad enzimática de forma directa, se realizó una cinética enzimática *in vitro* en el sobrenadante de homogenados del hipocampo. En los resultados, se observó que, mientras la NAM no ejerció un efecto inhibitor sobre la BChE, sí disminuyó la actividad enzimática de AChE mediante una acción inhibitora acompetitiva (Figura 8). Villeda-González y colaboradores (2020) reportaron a través de un acoplamiento molecular que la NAM tiene una mayor afinidad por el sitio activo de AChE que por el sitio activo de la BChE (Villeda-González et al., 2020), probablemente la diferencia de afinidad sea la razón por la que únicamente pudimos observar la inhibición de la AChE. Este hallazgo es muy importante debido a que la NAM, además de su efecto antioxidante y anti-inflamatorio, podría ser un regulador en la actividad alterada de AChE por las dietas hipercalóricas, disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, se requieren más estudios para saber los mecanismos por los que la NAM inhibe la actividad de AChE.

10. Conclusiones

La glucolipotoxicidad inducida por una dieta hipercalórica alteró múltiples parámetros bioquímicos en suero, incluyendo niveles de inflamación, estrés oxidante, la actividad de las colinesterasas y la capacidad antioxidante. Al mismo tiempo, en el hipocampo provocó un aumento en el estrés oxidante, la actividad de las colinesterasas. En conjunto, estas alteraciones promovieron un aumento en la permeabilidad de la BBB, así como un efecto negativo sobre la capacidad cognitiva.

La administración a largo plazo de NAM atenúa las alteraciones inducidas por la dieta hipercalórica, mejorando la sensibilidad a la insulina, reduciendo el estrés oxidante, la inflamación y la actividad de las ChEs en suero, además de aumentar la capacidad antioxidante. Por otra parte, en hipocampo la NAM disminuyó la actividad de las ChEs, el estrés oxidante y aumentó la capacidad antioxidante, lo cual se reflejó en una menor permeabilidad de la BBB y tuvo un efecto positivo sobre el aprendizaje y la memoria espacial.

Además, NAM ejerció un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la AChE de hipocampo en ratas CONTROL. Este proceso podría evitar el posible decremento de las concentraciones de ACh en hipocampo debido al aumento en la actividad de AChE, como observamos en nuestra investigación, promoviendo una adecuada sinapsis colinérgica y activar la vía colinérgica anti-inflamatoria en un ambiente de neuroinflamación, favoreciendo la función cognitiva.

La NAM tiene un importante efecto neuroprotector frente al daño cognitivo causado por el consumo excesivo de la dieta hipercalórica. Previene la disfunción de la BBB y,

por tanto, el deterioro cognitivo al disminuir la inflamación, el estrés oxidante, modular la actividad de las ChEs y aumentar la capacidad antioxidante en el hipocampo.

11. Perspectivas

Consideramos que es imperativo continuar con esta línea de investigación debido a la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad en México, así como al hecho de que el consumo de dietas hipercalóricas constituye un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer.

Realizar estudios en modelos animales enfocados en la corteza prefrontal, una región cerebral crucial para la capacidad cognitiva. Estos estudios permitirían una comprensión más profunda de las alteraciones inducidas por las dietas hipercalóricas.

Se plantea la necesidad de nuevas investigaciones sobre el efecto inhibitorio del NAM en la actividad enzimática de la AChE, una enzima clave en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, para la cual aún no existe cura.

Dados los efectos protectores de la NAM y los hábitos alimenticios poco saludables prevalentes, sería pertinente realizar estudios en la población mexicana sobre la ingesta de esta vitamina a través de la dieta y su correlación con enfermedades crónicas.

12. Referencias

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Alhazmi, H. A., & Albratty, M. (2022). An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 30(12), 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.10.004>
- Amin, K. A., Kamel, H. H., & Abd Eltawab, M. A. (2011). The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. *Lipids in health and disease*, 10, 74. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-74>
- Aryal, S. P., Fu, X., Sandin, J. N., Neupane, K. R., Lakes, J. E., Grady, M. E., & Richards, C. I. (2021). Nicotine induces morphological and functional changes in astrocytes via nicotinic receptor activity. *Glia*, 69(8), 2037–2053. <https://doi.org/10.1002/glia.24011>
- Avalos, J. L., Bever, K. M., & Wolberger, C. (2005). Mecanismo de inhibición de sirtuinas por nicotinamida: alteración de la especificidad del cosustrato NAD(+) de una enzima Sir2. *Célula molecular*, 17(6), 855–868. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.022>
- Berger, R. G., Lunkenbein, S., Ströhle, A., & Hahn, A. (2012). Antioxidants in food: mere myth or magic medicine?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(2), 162–171. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499481>
- Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M. C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J. M., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., & Gual, P. (2010). Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PloS one*, 5(10), e13577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013577>

Bhansali, S. G., Brazeau, D. A., Sonee, M., & Mukherjee, S. K. (2006). Nicotinamide prevents apoptosis in human cortical neuronal cells. *Toxicology mechanisms and methods*, 16(4), 173–180. <https://doi.org/10.1080/15376520500194726>

Biobaku, F., Ghanim, H., Batra, M., & Dandona, P. (2019). Macronutrient-mediated inflammation and oxidative stress: Relevance to insulin resistance, obesity, and atherogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(12), 6118–6128. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01833>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt - Food Science and Technology*, 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Brook, E., Mamo, J., Wong, R., Al-Salami, H., Falasca, M., Lam, V., & Takechi, R. (2019). Blood-brain barrier disturbances in diabetes-associated dementia: Therapeutic potential for cannabinoids. *Pharmacological research*, 141, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.009>

Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M. T., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase forms in microsomal membranes from normal and dystrophic Lama2dy mouse muscle. *Journal of neurochemistry*, 69(5), 1964–1974. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69051964.x>

Cabezas-Herrera, J., Moral-Naranjo, M.T., Campoy, F.J., & Vidal, C.J. (1997). Glycosylation of Acetylcholinesterase Forms in Microsomal Membranes from Normal and Dystrophic Lama2dy Mouse Muscle. *Journal of Neurochemistry*, 69. Doi:[10.1046/j.1471-4159.1997.69051964.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69051964.x)

Cardoso, F. L., Brites, D., & Brito, M. A. (2010). Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews*, 64(2), 328–363. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.003>

Castañeda E., Ortiz H., Robles Guadalupe., & Molina N. Nelly. (2016). Consumo de alimentos chatarra y estado nutricional en escolares de la Ciudad de México. *Revista Mexicana de Pediatría*; 83(1): 15-19.

Chen, V. P., Gao, Y., Geng, L., & Brimijoin, S. (2017). Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. *International journal of obesity* (2005), 41(9), 1413–1419. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.123>

Choi, H. J., Jang, S. Y., & Hwang, E. S. (2015). High-dose nicotinamide suppresses ROS generation and augments population expansion during CD8(+) T cell activation. *Molecules and cells*, 38(10), 918–924. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0168>

Coussen, F., Ayon, A., Le Goff, A., Leroy, J., Massoulié, J., & Bon, S. (2001). Addition of a glycoposphatidylinositol to acetylcholinesterase. Processing, degradation, and secretion. *The Journal of biological chemistry*, 276(30), 27881–27892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010817200>

Daniel, H., & Zietek, T. (2015). Taste and move: glucose and peptide transporters in the gastrointestinal tract. *Experimental physiology*, 100(12), 1441–1450. <https://doi.org/10.1113/EP085029>

D'Alonzo, Z., Lam, V., Nesbit, M., Graneri, L., Takechi, R., & Mamo, J. (2020). Chronic consumption of bovine dairy milk attenuates dietary saturated fatty acid-induced blood-brain barrier dysfunction. *Frontiers in nutrition*, 7, 58. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00058>

de Aquino, C. C., Leitão, R. A., Oliveira Alves, L. A., Coelho-Santos, V., Guerrant, R. L., Ribeiro, C. F., Malva, J. O., Silva, A. P., & Oriá, R. B. (2019). Effect of hypoproteic and high-fat diets on hippocampal blood-brain barrier permeability and oxidative stress. *Frontiers in nutrition*, 5, 131. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00131>

de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., Berthoud, H. R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R. M., &

Boeckxstaens, G. E. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature immunology*, 6(8), 844–851. <https://doi.org/10.1038/ni1229>

Duchnowicz, P., Ziobro, A., Rapacka, E., Koter-Michalak, M., & Bukowska, B. (2018). Changes in cholinesterase activity in blood of adolescent with metabolic syndrome after supplementation with extract from *Aronia melanocarpa*. *BioMed research international*, 2018, 5670145. <https://doi.org/10.1155/2018/5670145>

Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., León, R., & Lopez, M. G. (2015). Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochemical pharmacology*, 97(4), 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.032>

Elahy, M., Lam, V., Pallegage-Gamarallage, M. M., Giles, C., Mamo, J. C., & Takechi, R. (2015). Nicotine attenuates disruption of blood-brain barrier induced by saturated-fat feeding in wild-type mice. *Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 17(12), 1436–1441. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntv044>

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Continua (2022). Base de datos y documentación 2022, México. [Encuesta Nacional de Salud y Nutrición \(insp.mx\)](https://ensp.mx)

Eng, J. M., & Estall, J. L. (2021). Diet-induced models of non-alcoholic fatty liver disease: Food for thought on sugar, fat, and cholesterol. *Cells*, 10(7), 1805. <https://doi.org/10.3390/cells10071805>

Erickson, M. A., Dohi, K., & Banks, W. A. (2012). Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 19(2), 121–130. <https://doi.org/10.1159/000330247>

Etminan, M., Gill, S. S., & Samii, A. (2005). Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *The Lancet. Neurology*, 4(6), 362–365. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70097-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70097-1)

Fadel, J. R., & Reagan, L. P. (2016). Stop signs in hippocampal insulin signaling: the role of insulin resistance in structural, functional and behavioral deficits. *Current opinion in behavioral sciences*, 9, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.12.004>

Fania, L., Mazzanti, C., Campione, E., Candi, E., Abeni, D., & Dellambra, E. (2019). Role of Nicotinamide in Genomic Stability and Skin Cancer Chemoprevention. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5946. <https://doi.org/10.3390/ijms20235946>

Fernández-Quintela, A., Churrua, I., & Portillo, M. P. (2007). The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public health nutrition*, 10(10A), 1126–1131. <https://doi.org/10.1017/S1368980007000602>

Ferraris, R. P., Choe, J. Y., & Patel, C. R. (2018). Intestinal absorption of fructose. *Annual review of nutrition*, 38, 41–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051707>

Flores-Cordero, J. A., Pérez-Pérez, A., Jiménez-Cortegana, C., Alba, G., Flores-Barragán, A., & Sánchez-Margalet, V. (2022). Obesity as a risk factor for dementia and Alzheimer's Disease: The role of leptin. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 5202. <https://doi.org/10.3390/ijms23095202>

Fonseca, C. S. M., Basford, J. E., Kuhel, D. G., Konanilah, E. S., Cash, J. G., Lima, V. L. M., & Hui, D. Y. (2020). Distinct influence of hypercaloric diets predominant with fat or fat and sucrose on adipose tissue and liver inflammation in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(19), 4369. <https://doi.org/10.3390/molecules25194369>

Franco, R., & Vargas, M. R. (2018). Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging. *Antioxidants & redox signaling*, 28(18), 1583–1586. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7509>

Frazier, T. H., DiBaise, J. K., & McClain, C. J. (2011). Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 35(5 Suppl), 14S–20S.

<https://doi.org/10.1177/0148607111413772>

Fricker, R. A., Green, E. L., Jenkins, S. I., & Griffin, S. M. (2018). The influence of nicotinamide on health and disease in the central nervous system. *International journal of tryptophan research: IJTR*, 11, 1178646918776658.

<https://doi.org/10.1177/1178646918776658>

Gamage, R., Wagnon, I., Rossetti, I., Childs, R., Niedermayer, G., Chesworth, R., & Gyengesi, E. (2020). Cholinergic modulation of glial function during aging and chronic neuroinflammation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 577912.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577912>

Gao, H., Mejhert, N., Fretz, J. A., Arner, E., Lorente-Cebrián, S., Ehrlund, A., Dahlman-Wright, K., Gong, X., Strömblad, S., Douagi, I., Laurencikiene, J., Dahlman, I., Daub, C. O., Rydén, M., Horowitz, M. C., & Arner, P. (2014). Early B cell factor 1 regulates adipocyte morphology and lipolysis in white adipose tissue. *Cell metabolism*, 19(6), 981–992. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.032>

Gao, Y., Xu, Y., & Yin, J. (2022). Selenomethionine ameliorates cognitive impairment, decreases hippocampal oxidative stress and attenuates dysbiosis in D-galactose-treated mice. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(1), 111.

<https://doi.org/10.3390/antiox11010111>

Gasperi, V., Sibilano, M., Savini, I., & Catani, M. V. (2019). Niacin in the central nervous system: An update of biological aspects and clinical applications. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 974. <https://doi.org/10.3390/ijms20040974>

Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P., & Angelova, M. (2011). Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food chemistry*, 128(1), 100–105.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.083>

Gómez, J. L., García-Ayllón, M. S., Campoy, F. J., & Vidal, C. J. (2000). Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of Lama2(dy) mice. *Journal of neuroscience research*, 62(1), 134–145. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001001\)62:1<134::AID-JNR14>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001001)62:1<134::AID-JNR14>3.0.CO;2-T)

Gonzalez, J. T., & Betts, J. A. (2019). Dietary sugars, exercise and hepatic carbohydrate metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 78(2), 246–256. <https://doi.org/10.1017/S0029665118002604>

Gual-Grau, A., Guirro, M., Mayneris-Perxachs, J., Arola, L., & Boqué, N. (2019). Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *The Journal of nutritional biochemistry*, 71, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.005>

Guo, S., Chen, Q., Sun, Y., & Chen, J. (2019). Nicotinamide protects against skeletal muscle atrophy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Archives of physiology and biochemistry*, 125(5), 470–477. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1638414>

Gutiérrez-Solis, A. L., Garrido-Dzib, A. G., Rochel-Pérez, A., Magallón-Zertuche, V., Chávez-Loría, G., Medina-Vera, I., & Avila-Nava, A. (2023). Oxidative stress biomarkers in Mexican subjects with overweight and obesity: A systematic review. *Metabolic syndrome and related disorders*, 21(4), 188–196. <https://doi.org/10.1089/met.2023.0001>

Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, 141(7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>

Han, B., Li, X., & Hao, J. (2017). The cholinergic anti-inflammatory pathway: An innovative treatment strategy for neurological diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 77, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.002>

- Hargrave, S. L., Davidson, T. L., Zheng, W., & Kinzig, K. P. (2016). Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. *Behavioral neuroscience*, 130(1), 123–135. <https://doi.org/10.1037/bne0000110>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*, 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hsu, T. M., & Kanoski, S. E. (2014). Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 88. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00088>
- Hu, F. B., van Dam, R. M., & Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44(7), 805–817. <https://doi.org/10.1007/s001250100547>
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P., & Biesalski, H. K. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free radical biology & medicine*, 20(2), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Jiang, S., Liu, H., & Li, C. (2021). Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(8), 1854. <https://doi.org/10.3390/foods10081854>
- Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2010). Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, 36(2), 313–319. <https://doi.org/10.1037/a0017228>
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., & Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393(6683), 373–377. <https://doi.org/10.1038/30741>
- Kennedy D. O. (2016). B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy--a review. *Nutrients*, 8(2), 68. <https://doi.org/10.3390/nu8020068>

Ko, J. W., Chung, Y. S., Kwak, C. S., & Kwon, Y. H. (2019). doenjang, a korean traditional fermented soybean paste, ameliorates neuroinflammation and neurodegeneration in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 11(8), 1702.

<https://doi.org/10.3390/nu11081702>

Lane, R. M., Potkin, S. G., & Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 9(1), 101–124.

<https://doi.org/10.1017/S1461145705005833>

Lee, E. J., Wu, T. S., Chang, G. L., Li, C. Y., Chen, T. Y., Lee, M. Y., Chen, H. Y., & Maynard, K. I. (2006). Delayed treatment with nicotinamide inhibits brain energy depletion, improves cerebral microperfusion, reduces brain infarct volume, but does not alter neurobehavioral outcome following permanent focal cerebral ischemia in Sprague Dawley rats. *Current neurovascular research*, 3(3), 203–213.

<https://doi.org/10.2174/156720206778018749>

Leigh, S. J., & Morris, M. J. (2020). Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(6), 165767. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165767>

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464–478.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)

Li, C., Shi, L., Wang, Y., Peng, C., Wu, L., Zhang, Y., & Du, Z. (2021). High-fat diet exacerbates lead-induced blood-brain barrier disruption by disrupting tight junction integrity. *Environmental toxicology*, 36(7), 1412–1421.

<https://doi.org/10.1002/tox.23137>

Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26087–26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

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 stearyl-CoA desaturase, and spatial memory deficits in rats. *Nutrients*, 9(6), 619. <https://doi.org/10.3390/nu9060619>

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013, 321213. <https://doi.org/10.1155/2013/321213>

Liu, F., He, J., Wang, H., Zhu, D., & Bi, Y. (2020). Adipose morphology: a critical factor in regulation of human metabolic diseases and adipose tissue dysfunction. *Obesity surgery*, 30(12), 5086–5100. <https://doi.org/10.1007/s11695-020-04983-6>

Liu, L., & Liu, X. D. (2014). Alterations in function and expression of ABC transporters at blood-brain barrier under diabetes and the clinical significances. *Frontiers in pharmacology*, 5, 273. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00273>

López-Durán, R. M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., García-Suárez, M. D., Muñoz-Nava, H., Hernández-Hernández, Ángel, Vidal-Moreno, C., & Gómez-Olivares, J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 34, 69–80. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp02.06>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275. PMID: 14907713

Loza-Medrano, S. S., Baiza-Gutman, L. A., Manuel-Apolinar, L., García-Macedo, R., Damasio-Santana, L., Martínez-Mar, O. A., Sánchez-Becerra, M. C., Cruz-López, M.,

Ibáñez-Hernández, M. A., & Díaz-Flores, M. (2020). High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes. *Molecular biology reports*, 47(1), 337–351. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05136-4>

Luo, C., Yang, C., Wang, X., Chen, Y., Liu, X., & Deng, H. (2022). Nicotinamide reprograms adipose cellular metabolism and increases mitochondrial biogenesis to ameliorate obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 107, 109056. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109056>

Ly, M., Yu, G. Z., Mian, A., Cramer, A., Meysami, S., Merrill, D. A., Samara, A., Eisenstein, S. A., Hershey, T., Babulal, G. M., Lenze, E. J., Morris, J. C., Benzinger, T. L. S., & Raji, C. A. (2023). Neuroinflammation: A modifiable pathway linking obesity, Alzheimer's disease, and depression. *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 31(10), 853–866. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2023.06.001>

Macdonald, I. R., Maxwell, S. P., Reid, G. A., Cash, M. K., DeBay, D. R., & Darvesh, S. (2017). Quantification of butyrylcholinesterase activity as a sensitive and specific biomarker of alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 58(2), 491–505. <https://doi.org/10.3233/JAD-170164>

Maiese K. (2021). Nicotinamide as a Foundation for Treating Neurodegenerative Disease and Metabolic Disorders. *Current neurovascular research*, 18(1), 134–149. <https://doi.org/10.2174/1567202617999210104220334>

Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., & Shang, Y. C. (2009). The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(9), 3446–3485. <https://doi.org/10.3390/molecules14093446>

Malekmohammad, K., Sewell, R. D. E., & Rafieian-Kopaei, M. (2019). Antioxidants and atherosclerosis: Mechanistic aspects. *Biomolecules*, 9(8), 301. <https://doi.org/10.3390/biom9080301>

Malik, V. S., Li, Y., Pan, A., De Koning, L., Schernhammer, E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2019). Long-term consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened beverages and risk of mortality in US adults. *Circulation*, 139(18), 2113–2125. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037401>

Massoulié J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neuro-Signals*, 11(3), 130–143. <https://doi.org/10.1159/000065054>

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*, 41(1), 31–91. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90040-y](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90040-y)

McCullough A. J. (2006). Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical gastroenterology*, 40 Suppl 1, S17–S29. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000168645.86658.22>

McKee T, & McKee J.R. (2003). Metabolismo de los hidratos de carbono, *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. (3ra ed., pp. 234-271) McGraw Hill. <http://librodigital.sangregorio.edu.ec/librosusgp/02447.pdf>

McNay, E. C., Ong, C. T., McCrimmon, R. J., Cresswell, J., Bogan, J. S., & Sherwin, R. S. (2010). Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiology of learning and memory*, 93(4), 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.02.002>

Mejía, S. Á., Gutman, L., Camarillo, C. O., Navarro, R. M., Becerra, M., Santana, L. D., Cruz, M., Pérez, E. H., & Flores, M. D. (2018). Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. *European journal of pharmacology*, 818, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.048>

Méndez-Lara, K. A., Rodríguez-Millán, E., Sebastián, D., Blanco-Soto, R., Camacho, M., Nan, M. N., Diarte-Añazco, E., Mato, E., Lope-Piedrafita, S., Roglans, N., Laguna, J. C., Alonso, N., Mauricio, D., Zorzano, A., Villarroya, F., Villena, J. A., Blanco-Vaca,

F., & Julve, J. (2021). Nicotinamide protects against diet-induced body weight gain, increases energy expenditure, and induces white adipose tissue beiging. *Molecular nutrition & food research*, 65(11), e2100111. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100111>.

Merino, B., Fernández-Díaz, C. M., Cózar-Castellano, I., & Perdomo, G. (2019). Intestinal fructose and glucose metabolism in health and disease. *Nutrients*, 12(1), 94. <https://doi.org/10.3390/nu12010094>

Meshorer, E. (2002). Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science*, 295(5554), 508–512. <https://doi.org/10.1126/science.1066752>

Michaelis E. K. (2012). “Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: relationship to neurological diseases and mechanisms for differential sensitivity of neurons to stress,” in the clinical neurobiology of the hippocampus: An Integrative Review, ed Bartsch (Oxford, United Kingdom: Oxford University Press;), 54–76. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199592388.003.0004>

Milanova, I. V., Kalsbeek, M. J. T., Wang, X. L., Korpel, N. L., Stenvers, D. J., Wolff, S. E. C., de Goede, P., Heijboer, A. C., Fliers, E., la Fleur, S. E., Kalsbeek, A., & Yi, C. X. (2019). Diet-induced obesity disturbs microglial immunometabolism in a time-of-day manner. *Frontiers in endocrinology*, 10, 424. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00424>

Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>

Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)

Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2001). Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*, 1(6), 735–747. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200106\)1:6<735::AID-PROT735>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200106)1:6<735::AID-PROT735>3.0.CO;2-8)

Neha, Kumar, A., Jaggi, A. S., Sodhi, R. K., & Singh, N. (2014). Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathological changes in mouse model of high-fat-diet-induced experimental dementia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(8), 777–787. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-0990-4>

Noe, C. R., Noe-Letschnig, M., Handschuh, P., Noe, C. A., & Lanzenberger, R. (2020). Dysfunction of the blood-brain barrier-a key step in neurodegeneration and dementia. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 185. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00185>

OECD/FAO (2018), “OECD-FAO Agricultural Outlook (edición 2018)”, OECD Agriculture Statistics (Database), <https://doi.org/10.1787/d4bae583-en>

Ogata, S., Ito, S., Masuda, T., & Ohtsuki, S. (2019). Changes of blood-brain barrier and brain parenchymal protein expression levels of mice under different insulin-resistance conditions induced by high-fat diet. *Pharmaceutical research*, 36(10), 141. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2674-8>.

Ouyang, S., Hsueh, H., Kastin, A. J., Wang, Y., Yu, C., & Pan, W. (2014). Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(1), 43–51. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.166>

Oriá, R. B., Murray-Kolb, L. E., Scharf, R. J., Pendergast, L. L., Lang, D. R., Kolling, G. L., & Guerrant, R. L. (2016). Early-life enteric infections: relation between chronic systemic inflammation and poor cognition in children. *Nutrition reviews*, 74(6), 374–386. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw008>

Pallebage-Gamarallage, M., Lam, V., Takechi, R., Galloway, S., Clark, K., & Mamo, J. (2012). Restoration of dietary-fat induced blood-brain barrier dysfunction by anti-inflammatory lipid-modulating agents. *Lipids in health and disease*, 11, 117. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-117>

Parada, E., Egea, J., Buendia, I., Negredo, P., Cunha, A. C., Cardoso, S., Soares, M. P., & López, M. G. (2013). The microglial $\alpha 7$ -acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxidants & redox signaling*, 19(11), 1135–1148. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4671>

Pielak, M., Czarniecka-Skubina, E., Trafiałek, J., & Głuchowski, A. (2019). Contemporary trends and habits in the consumption of sugar and sweeteners-a questionnaire survey among poles. *International journal of environmental research and public health*, 16(7), 1164. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071164>

Pilling, D., Karhadkar, T. R., & Gomer, R. H. (2021). High-fat diet-induced adipose tissue and liver inflammation and steatosis in mice are reduced by inhibiting sialidases. *The American journal of pathology*, 191(1), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.011>

Piovesana, R., Salazar Intriago, M. S., Dini, L., & Tata, A. M. (2021). Cholinergic Modulation of Neuroinflammation: Focus on $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4912. <https://doi.org/10.3390/ijms22094912>

Pistell, P. J., Morrison, C. D., Gupta, S., Knight, A. G., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Bruce-Keller, A. J. (2010). Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *Journal of neuroimmunology*, 219(1-2), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.11.010>

Pitche P. T. (2005). Pellagre et érythèmes pellagroïdes [Pellagra]. *Sante (Montrouge, France)*, 15(3), 205–208.

Pugazhenth, S., Qin, L., & Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(5), 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>

Rakonczay Z. (2003). Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta biologica Hungarica*, 54(2), 183–189. <https://doi.org/10.1556/ABiol.54.2003.2.7>

Rao, A. A., Sridhar, G. R., & Das, U. N. (2007). Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*, 69(6), 1272–1276. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.03.032>

Reichelt, A. C., Stoeckel, L. E., Reagan, L. P., Winstanley, C. A., & Page, K. A. (2018). Dietary influences on cognition. *Physiology & behavior*, 192, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.052>

Rhea, E. M., Salameh, T. S., Logsdon, A. F., Hanson, A. J., Erickson, M. A., Banks, W. A. (2017). Blood-brain barriers in obesity. *The AAPS journal*, 19(4), 921–930. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0079-3>

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 & diabetes*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>

Rojas-Gutierrez, E., Muñoz-Arenas, G., Treviño, S., Espinosa, B., Chavez, R., Rojas, K., Flores, G., Díaz, A., & Guevara, J. (2017). Alzheimer's disease and metabolic syndrome: A link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration. *Synapse (New York, N.Y.)*, 71(10), e21990. <https://doi.org/10.1002/syn.21990>

Rosas-Ballina, M., & Tracey, K. J. (2009). Cholinergic control of inflammation. *Journal of internal medicine*, 265(6), 663–679. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x>

Rotundo R. L. (2017). Biogenesis, assembly and trafficking of acetylcholinesterase. *Journal of neurochemistry*, 142 Suppl 2(Suppl 2), 52–58. <https://doi.org/10.1111/jnc.13982>

Roy, P., Martinelli, I., Moruzzi, M., Maggi, F., Amantini, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Cifani, C., Amenta, F., Tayebati, S. K., & Tomassoni, D. (2021). Ion channels alterations in the forebrain of high-fat diet fed rats. *European journal of histochemistry: EJH*, 65(s1), 3305. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3305>

Rush, E. C., & Yan, M. R. (2017). Evolution not Revolution: Nutrition and Obesity. *Nutrients*, 9(5), 519. <https://doi.org/10.3390/nu9050519>

Sáez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C. A., & Small, D. H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 72(4), 1600–1608. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721600.x>

Sajja, R. K., Rahman, S., & Cucullo, L. (2016). Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(3), 539–554. <https://doi.org/10.1177/0271678X15616978>

Sánchez-Chávez G, Salceda R. Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*. 2008; 27(2): 44-51.

Segula D. (2014). Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi medical journal: the journal of Medical Association of Malawi*, 26(1), 20–24. PMID: 24959321

Silvestrini, A., Meucci, E., Ricerca, B. M., & Mancini, A. (2023). Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 10978. <https://doi.org/10.3390/ijms241310978>

Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., Jomova, K., Kollar, V., Rusko, M., & Valko, M. (2019). Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Archives of toxicology*, 93(9), 2491–2513. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02538-y>

Singh, A. & Bodakhe, S. H. (2021). Biochemical evidence indicates the preventive effect of resveratrol and nicotinamide in the treatment of STZ-induced diabetic cataract. *Current eye research*, 46(1), 52–63. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1782941>

Shenhar-Tsarfaty, S., Yayon, N., Waiskopf, N., Shapira, I., Toker, S., Zaltser, D., Berliner, S., Ritov, Y., & Soreq, H., (2015). Fear and C-reactive protein cosynergize annual pulse increases in healthy adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), E467–E471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418264112>

Shalev, D., & Arbuckle, M. R. (2017). Metabolism and memory: Obesity, diabetes, and dementia. *Biological psychiatry*, 82(11), e81–e83. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.025>

Siekmeier, R., Steffen, C., & März, W. (2007). Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 12(4), 265–282. <https://doi.org/10.1177/1074248407299519>

Singh, P. P., Mahadi, F., Roy, A., & Sharma, P. (2009). Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 24(4), 324–342. <https://doi.org/10.1007/s12291-009-0062-6>

Smith, A. C., Holden, R. C., Rasmussen, S. M., Hoane, M. R., & Hylin, M. J. (2019). Effects of nicotinamide on spatial memory and inflammation after juvenile traumatic brain injury. *Behavioural brain research*, 364, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.024>

Sodhi, R. K., & Singh, N. (2013). Defensive effect of lansoprazole in dementia of AD type in mice exposed to streptozotocin and cholesterol enriched diet. *PloS one*, 8(7), e70487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070487>

Song, S. B., Jang, S. Y., Kang, H. T., Wei, B., Jeoun, U. W., Yoon, G. S., & Hwang, E. S. (2017). Modulation of mitochondrial membrane potential and ros generation by nicotinamide in a manner independent of SIRT1 and mitophagy. *Molecules and cells*, 40(7), 503–514. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0081>

Song, S. B., Park, J. S., Chung, G. J., Lee, I. H., & Hwang, E. S. (2019). Diverse therapeutic efficacies and more diverse mechanisms of nicotinamide. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 15(10), 137. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1604-4>

Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>

Spector, R. (1979). Niacin and niacinamide transport in the central nervous system. In vivo studies. *Journal of Neurochemistry*; 33(4): 895–904.

Spector, R., & Johanson, C. E. (2007). Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *Journal of neurochemistry*, 103(2), 425–438. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04773.x>

Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18(11), 1085–1088. <https://doi.org/10.1002/hipo.20470>

Suzuki, T., Hide, I., Matsubara, A., Hama, C., Harada, K., Miyano, K., Andrä, M., Matsubayashi, H., Sakai, N., Kohsaka, S., Inoue, K., & Nakata, Y. (2006). Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *Journal of neuroscience research*, 83(8), 1461–1470. <https://doi.org/10.1002/jnr.20850>

Talip, T., Serudin, R., Noor, S., & Tuah, N. (2017). Qualitative study of eating habits in Bruneian primary school children. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 26(6), 1113–1118. <https://doi.org/10.6133/apjcn.022017.02>

Teo, P. S., van Dam, R. M., Whitton, C., Tan, L., & Forde, C. G. (2020). Consumption of foods with higher energy intake rates is associated with greater energy intake, adiposity, and cardiovascular risk factors in adults. *The Journal of nutrition*, nxaa344. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa344>

Thompson J., Manore M. M., & Vaughan L. A. (2008). *Nutrición*. Pearson Educación, Madrid (España), 326-328.

Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Analytical biochemistry*, 27 (3) 502–522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)

Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W. E., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2014). Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69(10), 1212–1226. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt177>

Turunc Bayrakdar, E., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E., & Yalcin, A. (2014). Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in A β (1-42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free radical research*, 48(2), 146–158. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.857018>

Ueno, M., Chiba, Y., Matsumoto, K., Murakami, R., Fujihara, R., Kawauchi, M., Miyanaka, H., & Nakagawa, T. (2016). Blood-brain barrier damage in vascular dementia. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 36(2), 115–124. <https://doi.org/10.1111/neup.12262>

Ullah, N., Lee, H. Y., Naseer, M. I., Ullah, I., Suh, J. W., & Kim, M. O. (2011). Nicotinamide inhibits alkylating agent-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *PloS one*, 6(12), e27093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027093>

Van der Kolk, B. W., Kalafati, M., Adriaens, M., van Greevenbroek, M. M. J., Vogelzangs, N., Saris, W. H. M., Astrup, A., Valsesia, A., Langin, D., van der Kallen, C. J. H., Eussen, S. J. P. M., Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D. A., Goossens, G. H., Arts, I. C. W., Jocken, J. W. E., Evelo, C. T., & Blaak, E. E. (2019). Subcutaneous adipose tissue and systemic inflammation are associated with peripheral but not hepatic insulin resistance in humans. *Diabetes*, 68(12), 2247–2258. <https://doi.org/10.2337/db19-0560>

Van Dyken, P., & Lacoste, B. (2018). Impact of metabolic syndrome on neuroinflammation and the blood-brain barrier. *Frontiers in neuroscience*, 12, 930. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>

Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, behavior, and immunity*, 60, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>

Villeda-González, J. D., Gómez-Olivares, J. L., Baiza-Gutman, L. A., Manuel-Apolinar, L., Damasio-Santana, L., Millán-Pacheco, C., Ángeles-Mejía, S., Cortés-Ginez, M. C., Cruz-López, M., Vidal-Moreno, C. J., & Díaz-Flores, M. (2020). Nicotinamide reduces inflammation and oxidative stress via the cholinergic system in fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Life sciences*, 250, 117585. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117585>

Vilela, W. R., Bellozi, P. M. Q., Picolo, V. L., Cavadas, B. N., Marques, K. V. S., Pereira, L. T. G., Guirao, A. R. Y., Amato, A. A., Magalhães, K. G., Mortari, M. R., Medei, E. H., Goulart, J. T. & de Bem, A. F. (2023). Early-life metabolic dysfunction impairs cognition and mitochondrial function in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 117, 109352. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109352>

Walker, J. M., & Harrison, F. E. (2015). Shared neuropathological characteristics of obesity, type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Impacts on cognitive decline. *Nutrients*, 7(9), 7332–7357. <https://doi.org/10.3390/nu7095341>

World Health Organization (2015). Guideline: Sugars intake for adults and children. WHO; Geneva, Switzerland: (accessed on 10 October 2018). Available

online:<http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugarintake/in/>[Google Scholar]

World Health Organization (2021). Dementia-World Health Organization <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Wright, E., Jr, Scism-Bacon, J. L., & Glass, L. C. (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *International journal of clinical practice*, 60(3), 308–314. <https://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2006.00825.x>

Wu, Y. J., Wang, L., Ji, C. F., Gu, S. F., Yin, Q., & Zuo, J. (2021). The role of $\alpha 7$ nAChR-mediated cholinergic anti-inflammatory pathway in immune cells. *Inflammation*, 44(3), 821–834. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01396-6>

Yamini, P., Ray, R. S., Yadav, S., Dhaliwal, J., Yadav, M., Kondepudi, K. K., & Chopra, K. (2022). $\alpha 7$ nAChR activation protects against oxidative stress, neuroinflammation and central insulin resistance in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 217, 173402. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173402>

Yang, S. J., Choi, J. M., Kim, L., Park, S. E., Rhee, E. J., Lee, W. Y., Oh, K. W., Park, S. W., & Park, C. Y. (2014). Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.004>

Ye, E. Q., Chacko, S. A., Chou, E. L., Kugizaki, M., & Liu, S. (2012). Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *The Journal of nutrition*, 142(7), 1304–1313. <https://doi.org/10.3945/jn.111.155325>

Yoo, D. Y., Yim, H. S., Jung, H. Y., Nam, S. M., Kim, J. W., Choi, J. H., Seong, J. K., Yoon, Y. S., Kim, D. W., & Hwang, I. K. (2016). Chronic type 2 diabetes reduces the integrity of the blood-brain barrier by reducing tight junction proteins in the

hippocampus. The Journal of veterinary medical science, 78(6), 957–962. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0589>

Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. The Journal of neuroscience: 32(18), 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>

Zandona, A., Lihtar, G., Maraković, N., Miš, K., Bušić, V., Gašo-Sokač, D., Pirkmajer, S., & Katalinić, M. (2020). Vitamin B3-based biologically active compounds as inhibitors of human cholinesterases. International journal of molecular sciences, 21(21), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms21218088>

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

Zhao, Y., Gan, L., Ren, L., Lin, Y., Ma, C., & Lin, X. (2022). Factores que influyen en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Investigación del cerebro, 1788, 147937. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147937>

Zheng, X., Deng, J., Zhang, T., Yao, J., Zheng, F., & Zhan, C. G. (2016). Potential anti-obesity effects of a long-acting cocaine hydrolase. Chemico-biological interactions, 259(Pt B), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.010>

Zlokovic B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. Nature reviews. Neuroscience, 12(12), 723–738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>

13. Artículo publicado

European Journal of Pharmacology 959 (2023) 176068



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Nicotinamide, an acetylcholinesterase uncompetitive inhibitor, protects the blood–brain barrier and improves cognitive function in rats fed a hypercaloric diet

A. Ramírez-Cruz^{a,b}, B. Gómez-González^c, L.A. Baiza-Gutman^d, L. Manuel-Apolinar^e,
S. Ángeles-Mejía^b, S.P. López-Cervantes^a, C. Ortega-Camarillo^b, M. Cruz-López^b,
J.L. Gómez-Olivares^f, M. Díaz-Flores^{b,*}

^a Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México

^b Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano Del Seguro Social, Ciudad de México, México

^c Departamento de Biología de La Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de La Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México

^d Laboratorio de Biología Del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

^e Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano Del Seguro Social, Ciudad de México, México

^f Laboratorio de Biomembranas, División de Ciencias Biológicas y de La Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Cholinesterases
Nicotinamide
blood–brain barrier
Hippocampus
Cognitive function
Caloric overload

ABSTRACT

Oxidative stress and inflammation induced by abundant consumption of high-energy foods and caloric overload are implicated in the dysfunction of the blood–brain barrier (BBB), cognitive impairment, and overactivation of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). These enzymes hydrolyse acetylcholine, affecting anti-inflammatory cholinergic signalling. Our aim was to evaluate whether nicotinamide (NAM) attenuates the impairment of the BBB and cognitive function, improving cholinergic signalling. Forty male rats were distributed into five groups: one group was fed a standard diet, and the remaining groups were fed a high-fat diet and a beverage with 40% sucrose (HFS; high-fat sucrose). In three of the HFS groups, the carbohydrate was replaced by drinking water containing different concentrations of NAM for 5 h every morning for 12 weeks. The biochemical profile, levels of stress and inflammation markers, cholinesterase activities, BBB permeability, and cognitive capacity were evaluated. The results showed that the HFS diet disturbed the metabolism of carbohydrates and lipids, causing insulin resistance. Simultaneously, AChE and BChE activities, levels of proinflammatory cytokines, oxidation of proteins and lipoperoxidation increased along with decreased antioxidant capacity in serum. In the hippocampus, increased activity of cholinesterases, protein carbonylation and lipoperoxidation were associated with decreased antioxidant capacity. Systemic and hippocampal changes were reflected in increased BBB permeability and cognitive impairment. In contrast, NAM attenuated the above changes by reducing oxidative stress and inflammation through decreasing cholinesterase activities, especially by uncompetitive inhibition. NAM may be a potential systemic and neuroprotective agent to mitigate cognitive damage due to hypercaloric diets.

* Corresponding author. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, C.P. 06725, Ciudad de México, México.

E-mail addresses: armando.050689@hotmail.com (A. Ramírez-Cruz), bgomezg@igmail.com (B. Gómez-González), labaisa@unam.mx (L.A. Baiza-Gutman), letymanu@yahoo.com.mx (L. Manuel-Apolinar), selenel983bc@hotmail.com (S. Ángeles-Mejía), stfn_pao@hotmail.com (S.P. López-Cervantes), cocamarillo2014@gmail.com (C. Ortega-Camarillo), mcrusl@yahoo.com (M. Cruz-López), gool@xanum.uam.mx (J.L. Gómez-Olivares), mardiaz2001@yahoo.com (M. Díaz-Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176068>

Received 29 June 2023; Accepted 19 September 2023

Available online 27 September 2023

0014-2999/© 2023 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Hypercaloric diets have been exhaustively studied to explain their negative effects on cognitive function since adiposity is considered a risk factor for neurodegenerative diseases (Kanoski, et al., 2010). Many studies have found that the high energy content of these diets promotes an oxidative state that incites the inflammatory response, causing disturbances in metabolically active organs and tissues, such as the neurovascular system affecting the blood-brain barrier (BBB) and interfering with hippocampal-dependent learning and memory (Yang et al., 2017; de Paula et al., 2021).

The increased reactive oxygen species (ROS) caused by the hypercaloric diets activate the nuclear factor kappa B and this induces the synthesis of proinflammatory cytokines, which together with ROS causes BBB hyperpermeability, allowing the passage of immune cells and macromolecules (Sajja et al., 2016; Galley and Straub, 2017; D'Alonzo et al., 2020). Simultaneously, oxidative stress decreases the concentration of reduced glutathione (GSH). GSH is an antioxidant that protects cells against free radicals, peroxides, and other toxic compounds. A decrease in GSH in the brains of Alzheimer's disease patients has been considered a clinically relevant biomarker for mild cognitive impairment (Mandal et al., 2015). High-fat diet (HFD) increase the oxidized form of glutathione (GSSG), affecting the GSH/GSSG ratio and increasing lipoperoxidation and protein carbonylation in several brain areas (Alzoubi et al., 2021; Haddad et al., 2021). On the other hand, a HFD activates neuraminidases that remove sialic acid, lengthening the clearance of some enzymes, such as acetylcholinesterase (Silveyra et al., 2006; Pilling et al., 2021).

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) are enzymes that hydrolyse acetylcholine, a neurotransmitter with anti-inflammatory properties (Fujii et al., 2017). Acetylcholine prevents the release of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by binding to its $\alpha 7$ nicotinic receptor in macrophages and other immune, nonneuronal, and neuronal cells (Shenhar-Tsarfaty et al., 2015), a mechanism called the cholinergic anti-inflammatory pathway (Zivkovic et al., 2015). In metabolic syndrome and obesity, cholinesterase activity is increased, causing a decrease in acetylcholine (Duchnowicz et al., 2018; Shenhar-Tsarfaty et al., 2019). These dynamics are typical of Parkinson's and Alzheimer's diseases (Lane et al., 2006).

Cholinergic stimulation improves the metabolic dysfunction associated with obesity, attenuating neuroinflammatory disorders (Chang et al., 2019). In this respect, an innovative and promising therapeutic strategy may involve the vitamin nicotinamide (NAM). NAM is the amide form of nicotinic acid and precursor of NAD⁺, an essential co-enzyme for cellular oxidation-reduction reactions (Loza-Medrano et al., 2020). The low availability of NAD⁺ affects brain metabolism; therefore, cognitive ability could be improved by increasing the pool of NAD⁺ (Maiese, 2021). NAM mononucleotide (NMN) increases NAD⁺ levels, helping to avoid cognitive deterioration in aged mice (Tarantini et al., 2019). Likewise, NMN and nicotinamide riboside decrease neuroinflammation, mitigate amyloidogenesis, prevent hippocampal neuronal loss, and improve cognitive function in diabetic rodents exposed to a HFD (Xie et al., 2019). The purpose of the present study was to evaluate whether NAM attenuates cholinergic signalling deficits and the proinflammatory and prooxidative environment, preventing BBB breakdown and cognitive deficit induced by a hypercaloric diet.

2. Materials and methods

2.1. Ethical animal management

The experimental procedures were carried out in accordance with the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999, revised 2015) for the care and use of laboratory animals and were approved by the Local Committee of Research and Ethics in Health of the Instituto Mexicano

del Seguro Social (IMSS; R-2020-3601-257).

2.2. Animals and treatments

Forty male Sprague-Dawley rats (250 $\pm$ 5 g) were provided by the Vivarium of the National Medical Center Century XXI of the IMSS and maintained in optimum humidity (50%) and temperature (23 °C) conditions. One week before the experiments began, the rats were acclimated to light/dark periods (12/12 h) and ventilation. Later, the rats were housed individually in acrylic boxes and divided randomly into five groups (n = 8 per group): one group was fed a standard diet (LABDIET 5008: 6.5% fat, 23% protein and 46.5% carbohydrates; CONTROL) and plain water. The remaining groups were fed a high-fat diet (18.5% fat, 15% protein and 41.5% carbohydrate) and drinking water containing 40% sucrose (HFS; high-fat diet + 40% sucrose). In three of the HFS groups, the carbohydrate was replaced by drinking water containing different concentrations of NAM (5, 10, and 15 mM; HFS-NAMS, HFS-NAM10, HFS-NAM15, respectively) for 5 h every morning for 12 weeks. During the treatment period, the consumption of food, liquids and body weight were recorded three times each week (Fig. 1).

2.3. Memory and spatial learning essay

The Morris water maze (Morris, 1984) was used to evaluate spatial learning and memory. The test required a pool (150 cm diameter, 50 cm deep) divided into virtual quadrants, and different paper and coloured figures were placed on the walls of each quadrant. A transparent acrylic platform (25 $\times$ 12 $\times$ 12 cm) was placed in the center of one of the quadrants. The pool was filled (3/5) with water stained with gentian violet at a temperature of 26 $\pm$ 2 °C, ensuring that the platform remained 2 cm below the water level. The experiment consisted of 2 stages: training and retention. In the training stage (learning), a rat was placed in one quadrant facing the wall. The latency to find the hidden platform was recorded; if the rat found the platform before 60 s, it was left on it for 15 s. Otherwise, it was led to the platform, left on it for 15 s, and then returned to its home cage. Each rat performed the task daily from each quadrant for 5 consecutive days. After the training period, the rats were allowed to rest for 2 days. In the retention stage (memory), the platform was removed, and the rats were placed in the opposite quadrant in relation to the original platform location. The rats were allowed to swim for 60 s, and the time they swam in the quadrant where the platform was previously located was recorded. After the test, the rats were removed from the pool. All tests were video recorded and analysed manually by a blinded rater.

2.4. Biological samples

At the end of the treatments, the animals were weighed and anaesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg, i. p.). Blood samples were obtained by cardiac puncture, placed in tubes without anticoagulant, and centrifuged at 1500 $\times$ g for 15 min (Sorvall Legend Mach 1.6 R centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Serum was stored at -70 °C and thawed immediately before use. The brain was removed, and the hippocampus was dissected and stored at -70 °C until use.

2.5. Determination of metabolic marker concentrations

Concentrations of serum markers such as glucose (GLU), total cholesterol (TC), triacylglycerols (TG), high-density lipoprotein (C-HDL), and low-density lipoprotein (C-LDL) were determined using a SPOTCHEM EZ SP-4430 automated analyser (ARKRAY, Inc., Miami, Florida, USA). Free fatty acids (FFA) were quantified using a colorimetric kit (BioVision, Milpitas, California, USA), and the absorbance was measured at 570 nm.

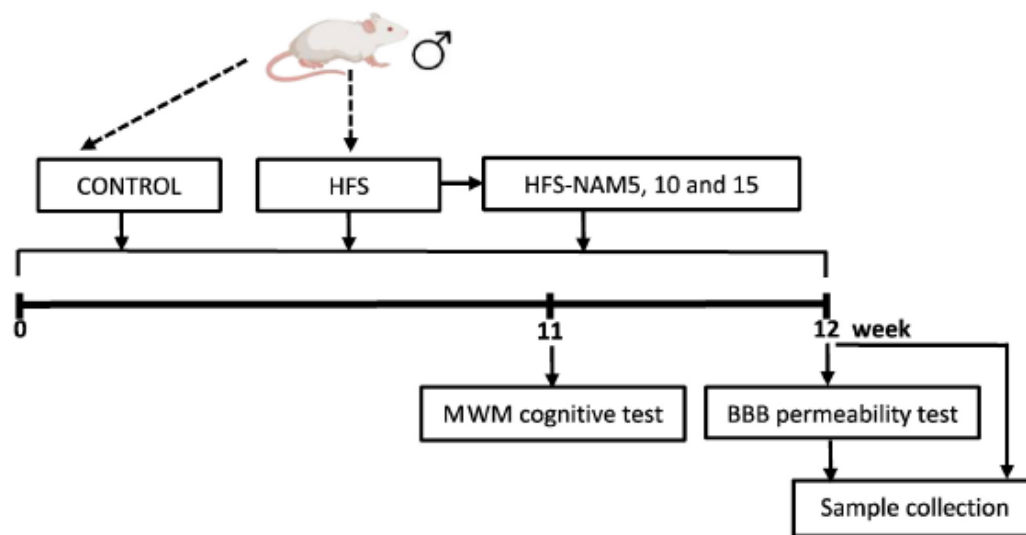


Fig. 1. Experimental design of administration of HFS diet and treatment with NAM. CONTROL; standard diet, HFS; High Fat Diet + 40% Sucrose, HFS-NAM5, 10 y 15; HFS + 5, 10, and 15 mM nicotinamide, MWM; Morris Water Maze, BBB; blood-brain barrier.

2.6. Determination of proinflammatory cytokine and insulin levels

The levels of IL-6, TNF- α and insulin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's protocols. Plates were read at an absorbance of 450 nm using an ELISA microplate reader (LabSystems Multiskan EX 96-well microplate reader, Helsinki, Finland). Intra-assay coefficients of variation less than 7% were considered acceptable. A standard curve was generated for each assay. To determine insulin resistance, the HOMA-IR was calculated using the following formula: $[(\text{insulin } \mu\text{U/mL}) \times (\text{glucose mg/dL})]/405$.

2.7. Determination of lipoperoxidation in serum and hippocampus

Liperoxidation was quantified in hippocampal homogenates (in 0.1 M PBS, pH 7.5) and serum through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Jentzsch et al., 1996). Briefly, 10% trichloroacetic acid was added to each serum aliquot and hippocampal homogenate; the mixtures were maintained on ice and then centrifuged at $20\,000\times g$ at 4°C for 15 min (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany). Thiobarbituric acid (0.11 mM) was added to the supernatants, which were vortexed and warmed at 100°C for 60 min, after which the samples were cooled at room temperature, vortexed, and centrifuged. The absorbance was read at 535 nm. A reference standard was prepared with 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

2.8. Determination of GSH concentration in the serum and hippocampus

Hippocampal pieces were homogenized (10% w/v) in 5% metaphosphoric acid to determine the GSH concentrations. The homogenates were centrifuged at $20\,000\times g$ at 4°C for 20 min (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany), and the supernatants were collected. GSH in the serum and supernatants was determined spectrophotometrically using Ellman reagent [5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB]. This assay is based on the stoichiometric reaction between DTNB and the thiol group of GSH. The product, nitromercapto benzoate, has a maximum absorbance at 412 nm proportional to the GSH concentration (Tietze, 1969).

2.9. Determination of GSSG in the hippocampus and serum

Hippocampal pieces were homogenized (10% w/v) in 0.1 M PBS pH 7.5, centrifuged at $10\,000\times g$ at 4°C for 20 min (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany), and the supernatants were used for the measurements. For the assessment of GSSG, an enzymatic method was used after the treatment of supernatant and serum with 10 mM 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulfonate, which sequesters thiol groups without interfering with glutathione reductase (GR) present in the assay. GSSG was reduced to GSH by GR in the presence of NADPH $^+$, and the generated GSH was quantified using Ellman reagent.

2.10. Determination of protein carbonyls in the hippocampus and serum

The carbonyl group was analysed spectrophotometrically (Levine et al., 1990; modified). The assay is based on the reaction between 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and protein carbonyls, forming a Schiff base to produce the corresponding hydrazone, which is read at 370 nm. For this, it was necessary to prepare hippocampal homogenates in 0.1 M PBS containing 1 mM EDTA at pH 6.7 and centrifuged at $10\,000\times g$ for 10 min at 4°C (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany). The supernatants were removed, and the pellets were resuspended in PBS. Aliquots of serum or resuspended pellet were transferred to 2 tubes: one was considered a sample tube, and the other was considered a control tube, in which DNPH in 2.5 M HCl or 2.5 M HCl were respectively added. Samples were incubated in the dark for 1 h. Thereafter, trichloroacetic acid (20% TCA) was added to each tube, and samples were vortexed, incubated at 4°C for 15 min, and centrifuged at $10\,000\times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was discarded, and the step was repeated using 10% TCA. Thereafter, the supernatant was discarded, and the pellet was washed (3 times) with ethanol/ethyl acetate (1/1; v/v) to remove free DNPH reagent. The pellets were resuspended in 6 M guanidine hydrochloride, vortexed, and centrifuged at $10\,000\times g$ for 10 min at 4°C . Finally, aliquots of the supernatant from the control and sample tubes were read at 370 nm.

The results were reported as follows:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mL)} = \frac{\text{Absorbance sample} - \text{Absorbance control}}{E} \left(\frac{A}{B} \right)$$

where E = Extinction coefficient for DNPH ($0.011 \mu\text{M}^{-1}$) was adjusted for the path length of the solution in the well; A = Final reaction volume; and B = Volume read in the well.

2.11. Determination of antioxidant capacity in the hippocampus and serum

The antioxidant capacity was determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay (Brand-Williams et al., 1995). For this, 0.1 mM DPPH was dissolved in 80% methanol (DPPH-methanol). Serum aliquots and hippocampal homogenates in PBS (10% w/v) were reacted with DPPH-methanol (1:29), vortexed, incubated for 60 min at room temperature in the dark, and then centrifuged at $9000 \times g$ for 10 min at 4°C (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany). An aliquot of the supernatant was read in an ELISA reader at 517 nm. The results, reported as the rate of elimination of the DPPH radical, were calculated as follows:

$$\text{DPPH scavenging rate (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} (100)$$

where A_0 = negative control (DPPH-methanol); A_1 = system containing the sample (DPPH-methanol plus serum/hippocampal homogenate); and A_2 = blank (sample plus methanol).

2.12. BChE and AChE specific activity assay

Hippocampal fragments were homogenized (10% w/v) in 15 mM Tris-hydrochloride (containing 1 M NaCl, 50 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA and 3 mM EDTA), pH 7.5, and 1% Brij-97 a non-ionic surfactant used to solubilize the cholinesterases, anchored to the cell membrane. The homogenized samples were centrifuged at $20\,000 \times g$ at 4°C for 15 min (Sorvall ST-40 R, Thermo Scientific, Germany), and the supernatants were separated to measure the activities. BChE and AChE activities were determined by the Ellman method (Ellman et al., 1961). Aliquots of serum or supernatant were pretreated with specific inhibitors of each enzyme (2 mM iso-OMPA and 4 mM BW284C51, respectively) in 0.1 M PBS with 0.01 M DTNB for 20 min at room temperature, and then thio analogues of the natural substrates of BChE and AChE (11 mM butyrylthiocholine and 11 mM acetylthiocholine, respectively) were added. DTNB oxidized free thiol groups, producing 5-thio-2-nitrobenzoate, which produced a yellow colour that was read at 412 nm. The activity was expressed as U/mg protein, where one unit is defined as the amount of enzyme that will hydrolyse 1.0 μmol of substrate per min. Protein concentration was measured using the modified Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.13. In vitro inhibition of AChE activity by NAM

Considering the specific action of AChE in the hydrolysis of acetylcholine, it was decided to study only the effect of NAM on this enzyme *in vitro*. Hippocampal homogenates from CONTROL rats were used to determine the maximum velocity (V_{max}) and the Michaelis-Menten constant (K_m) at different concentrations of the substrate (50–1000 μM acetylthiocholine). Subsequently, to determine the type of inhibition, AChE activity was measured with different concentrations of the substrate in the presence of different concentrations of NAM (2.5–15 mM), evaluating the type of inhibition using the Lineweaver-Burk procedure ($1/[S]$ vs. $1/V_{\text{max}}$). Homogenization and evaluation of enzymatic activity were carried out as mentioned above.

2.14. BBB permeability assay

After the treatments were finished, all animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg, i. p.). A left-side thoracic incision was made on each animal to expose the heart and administer 2 mL/kg body weight of a cocktail of Na-fluorescein (NaF; 10 mg/mL) and Evans blue (EB; 1 mg/mL) was intracardially administered. After 5 min of tracer circulation, the rats were transcardially perfused with saline (0.9% w/v) for 5 min. The brain was removed, and the hippocampus was extracted to evaluate the tracers that leak to the perivascular tissue. The samples were homogenized in 0.1 M PBS and centrifuged at $16\,000 \times g$ for 10 min. Afterwards, 200 μL of anhydrous methanol was added to the supernatant, vortexed, and centrifuged at $16\,000 \times g$ for 10 min. The supernatants were collected and placed in a 96-well plate, and the light emitted by the tracers after their excitation with UV light were quantified in a fluorescence ELISA plate reader HLAB (Beckham Coulter, dtx880 Multimode Detector) using an excitation filter of 485 nm and an emission filter of 535 nm for NaF and 535 nm excitation and 595 nm emission filters for EB. Each sample was analysed in duplicate, and the concentration of the tracers was calculated using a standard curve. The results are presented as the concentration of the tracer per weight of wet hippocampus tissue (mg/g).

2.15. Statistical analysis

The results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed with ANOVA, and the Tukey-Kramer test was used for post hoc analyses between groups. All statistical calculations were performed using GraphPad Prism 6 software, and values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. NAM reduces adipose tissue and increases muscle mass in rats subjected to a hypercaloric regimen

The HFS diet decreased food and liquid intake; however, the calories consumed were approximately double, without changes in body weight when compared with those in the CONTROL group. In addition, the HFS group showed a significant increase in visceral and epididymal adipose tissue (190% and 149%, respectively), along with a significant decrease in quadriceps muscle mass (39.8%), compared to those in the CONTROL group. Significantly decreased visceral and epididymal adipose tissue (61% and 60%, respectively) and increased quadriceps muscle mass (50%) were observed in the HFS-NAM5 group compared to the HFS group, with similar values to the CONTROL group (Table 1).

3.2. NAM improves the metabolic profile by decreasing insulin resistance and proinflammatory cytokines

As shown in Table 2, there were significant and pronounced increases in serum GLU (50%), insulin (29%), TG (68%), FFA (503%) and HOMA-IR (96%) in the HFS group compared to those in the CONTROL group. The HFS group showed a 35% reduction in C-HDL compared to the CONTROL group. In contrast, the HFS-NAM5 and HFS-NAM10 groups presented decreased GLU (37% and 29%, respectively) and TG (63% and 51%, respectively) compared with the values of the HFS group. The three doses of NAM (5, 10, and 15 mM) significantly decreased FFA serum levels (81%, 305%, and 71%, respectively), insulin

Table 1
Effect of NAM on body weight, adipose tissue and muscle mass in rats fed with HFS diet.

Parameters	Control	HFS	HFS-NAM5	HFS-NAM10	HFS-NAM15
Initial weight (g)	248 ± 1.3	252 ± 1.3	250 ± 0.8	248 ± 1.0	250 ± 1.1
End weight (g)	436 ± 5.4	446 ± 14	398 ± 13	436 ± 19.3	444 ± 13
Weight gain (g)	188 ± 5.9	195 ± 13.9	148 ± 13	186 ± 19.3	194 ± 12.6
Calories (Kcal/week)	533 ± 13.1	850 ± 27.1***	892 ± 36.4	878 ± 25.2	909 ± 45.1
Visceral Adipose Tissue (g)	4.27 ± 0.4	12.4 ± 1.1***	4.8 ± 0.8***	8.8 ± 1.4	9.7 ± 0.8
Epididymal Adipose Tissue (g)	2.55 ± 0.5	6.3 ± 0.7***	2.5 ± 0.5***	4.2 ± 0.5	4.3 ± 0.4
Quadriceps Muscle Mass (g)	5.93 ± 0.5	3.6 ± 0.2**	5.7 ± 0.3**	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.3

Values are expressed as means ± SEM of 8 animals per group. **p < 0.01, ***p < 0.001 whit respect to CONTROL group and **p < 0.01 and ***p < 0.001 whit respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test.

Table 2
Effect of NAM on biochemical and inflammation parameters in serum of rats fed with HFS diet.

PARAMETERS	CONTROL	HFS	HFS-NAM5	HFS-NAM10	HFS-NAM15
Biochemicals					
GLU (mg/dL)	83.3 ± 4.8	125 ± 4.7***	78.8 ± 5.4***	88.8 ± 5.2***	100 ± 2.6
Insulin (μU/mL)	13.7 ± 0.09	17.7 ± 0.24*	15.8 ± 0.60*	14.2 ± 1.21*	13.4 ± 1.06*
TC (mg/dL)	64.0 ± 2.8	71.5 ± 2.5	64.5 ± 1.6	62.0 ± 1.4	60.0 ± 4.5*
TG (mg/dL)	66.3 ± 13.7	112 ± 9.8*	41.3 ± 2.3***	54.8 ± 10.5*	82.8 ± 10.4
C-HDL (mg/dL)	41.8 ± 3.4	27.2 ± 2.9**	39.8 ± 1.4*	38.8 ± 1.5*	35 ± 3.0
C-LDL (mg/dL)	11.3 ± 1.9	15.3 ± 2.3	14.5 ± 1.3	9 ± 2.8	8 ± 2.4
FFA (nmol/mL)	10.4 ± 1.3	60.3 ± 20.9*	11.5 ± 3.5*	17.4 ± 6.5*	10.4 ± 1.9*
HOMA-IR	2.7 ± 0.17	5.3 ± 0.22***	2.8 ± 0.22***	3.1 ± 0.47**	3.2 ± 0.31**
Inflammation biomarkers					
TNF-α (pg/mL)	4.8 ± 0.3	6.9 ± 0.2*	7.1 ± 0.8	6.9 ± 0.4	7.1 ± 0.4
IL-6 (pg/mL)	2.5 ± 0.6	14.2 ± 0.8***	2.0 ± 0.4***	4.1 ± 1.4**	6.4 ± 2.9

Values are expressed as means ± SEM of 8 animals per group. *p < 0.05, **p < 0.001 y ***p < 0.001 whit respect to CONTROL group and *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 whit respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test. GLU; glucose, TC; total cholesterol, TG; triacylglycerols, C-HDL; High-density lipoprotein cholesterol, C-LDL; low density lipoprotein cholesterol, FFA; free fatty acids, HOMA-IR; Insulin resistance, TNF-α; tumor necrosis factor α, IL-6; interleukin 6.

(12%, 20% and 24%, respectively) and HOMA-IR (46%, 41% and 38% respectively) compared to those in the HFS group. The concentration of TC decreased only in the HFS-NAM15 group (16%) compared to that in the HFS group (Table 2).

On the other hand, the HFS diet significantly increased TNF-α (44.3%) and IL-6 (451%) with respect to the CONTROL group. NAM 5 and NAM 10 presented a decrease in IL-6 levels (86% and 71%, respectively) compared with those of the HFS group.

3.3. NAM reduces lipoperoxidation, protein carbonyls and cholinesterase activity, increasing antioxidant capacity and the GSH/GSSG ratio in serum

In the serum, lipid peroxidation and oxidation of proteins increased significantly in the HFS group (64%; Fig. 2A and 48%; Fig. 2B, respectively) along with AChE and BChE activity (~50%, Fig. 2E and F) compared with those in the CONTROL group. In addition, the antioxidant capacity and redox state, evaluated by DPPH and the GSH/GSSG ratio, respectively, decreased (23.5%; Figs. 2C and 52%; Fig. 2D) in the HFS group compared to the CONTROL group. In contrast, 5, 10, and 15 mM HFS-NAM decreased lipoperoxidation (43%, 65%, and 29%, respectively), protein carbonyls (~37%), AChE activity (25%, 33%, and 34%, respectively), and BChE activity (60%, 28%, and 40%, respectively) compared to the HFS group. The NAM5, 10 and 15 groups also showed increased ability to scavenge the DPPH radical (~39%) and had a raised GSH/GSSG ratio (104%, 159% and 93%, respectively) compared to the HFS group.

3.4. NAM reduces lipoperoxidation, protein carbonyls and cholinesterase activity, increasing antioxidant capacity and the GSH/GSSG ratio in the hippocampus

In the hippocampus, the HFS group showed similar results to those observed in serum, TBARS and protein carbonyls increased (47%, 166%;

Fig. 3A and B, respectively), AChE (64%, Fig. 3E) and BChE (300%, Fig. 3F) activities increased, while the antioxidant capacity and GSH/GSSG ratio decreased (20%; Figs. 3C and 58%; Fig. 3D, respectively) compared to those in the CONTROL group. NAM exerted an antioxidant effect by significantly decreasing TBARS in the HFS-NAM5, 10, and 15 groups (40%, 29%, and 31%, respectively) simultaneously with an increase in the GSH/GSSG ratio (62%, 185%, and 81%, respectively) and antioxidant capacity (26%, 34%, and 33%, respectively) compared to the HFS group. A significant decrease in protein carbonyls was also observed in the hippocampus of the HFS-NAM10 and 15 groups (40% and 60%, respectively). In the case of cholinesterase activity, NAM decreased AChE activity by ~29% and exhibited a more pronounced decrease of 70% in BChE activity compared to the HFS group, with values close to those of the CONTROL group.

3.5. NAM decreases BBB permeability in the hippocampus

BBB permeability to EB and NaF was evaluated in all the groups. The HFS group had the highest increase in dye extravasation of the tracers (5.34 and 7 times more, respectively, Fig. 4A and B) compared to the CONTROL group. In contrast, NAM significantly decreased BBB permeability; reduced EB extravasation was observed in the HFS-NAM5 group (2.6-fold) and the HFS-NAM10 group (1-fold) compared to the HFS group (Fig. 4A). In the HFS-NAM5, 10, and 15 mM groups, NaF extravasation decreased significantly (~1.5-fold) compared to that in the HFS group (Fig. 4B).

3.6. NAM mitigates cognitive impairment induced by caloric overload

Cognitive ability was assessed using the Morris water maze test after 12 weeks of HFS diet administration. During the test, learning (latency) and memory (retention) were evaluated. During the training phase, the CONTROL group presented a steady decrease in latency over the 5 days; meanwhile, the HFS group showed a deficit in learning on Days 2, 3, 4,

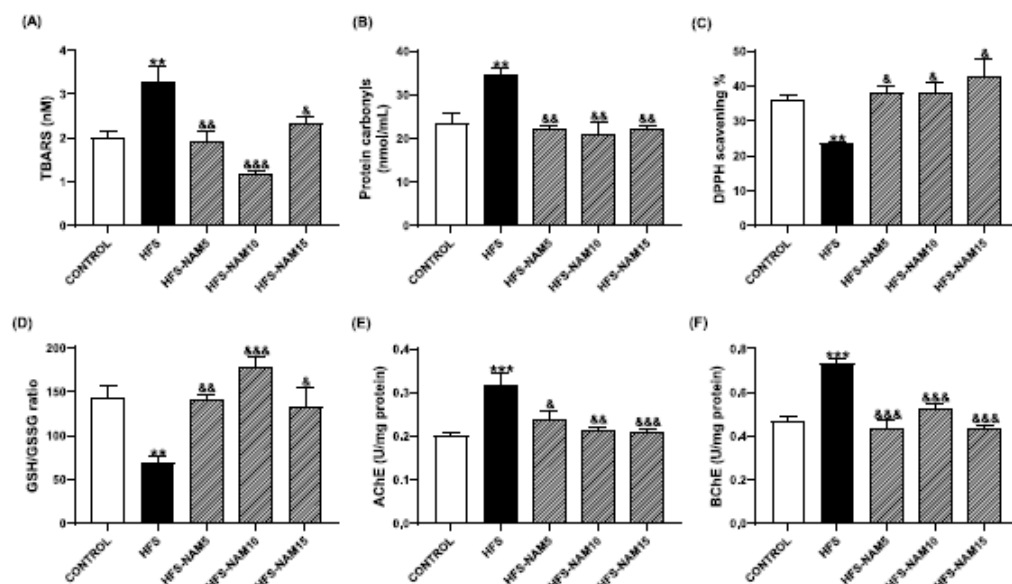


Fig. 2. Effect of NAM on oxidative stress markers and cholinesterase activities in serum of rats fed with HFS diet. (A) TBARS concentrations. (B) Protein carbonyls. (C) DPPH scavenging %. (D) GSH/GSSG ratio. (E) AChE specific activity. (F) BChE specific activity. Values are expressed as means $\pm$ SEM of 8 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ whit respect to CONTROL group and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ whit respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test.

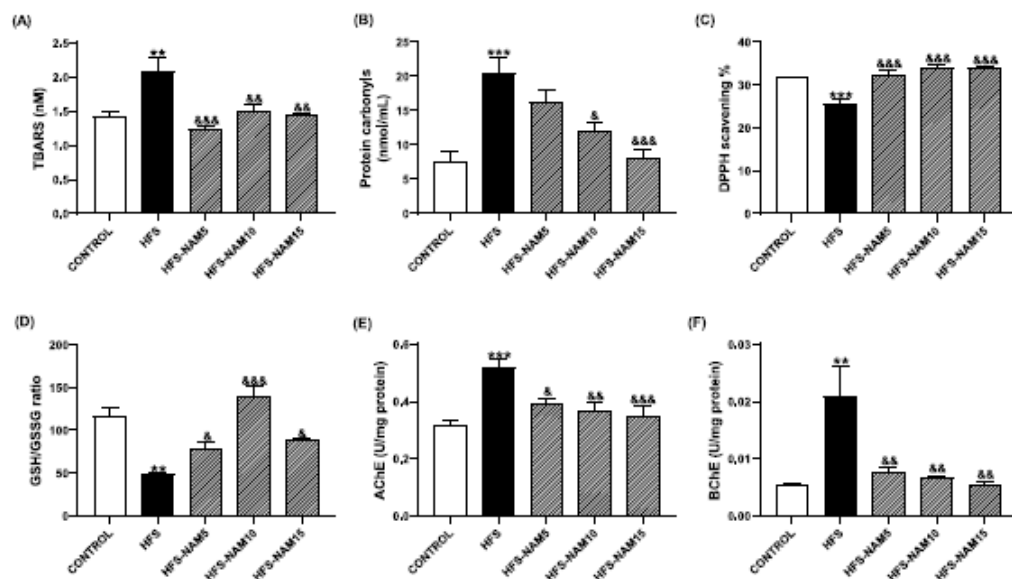


Fig. 3. Effect of NAM on oxidative stress markers and cholinesterase activities in hippocampus of rats fed with HFS diet. (A) TBARS concentrations. (B) Protein carbonyls. (C) DPPH scavenging %. (D) GSH/GSSG ratio. (E) AChE specific activity. (F) BChE specific activity. Values are expressed as means $\pm$ SEM of 8 animals per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ whit respect to CONTROL group and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ whit respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test.

and 5, as depicted by higher latencies to reach the hidden platform (1, 2.5, 1.5 and 2.7 times higher, respectively, Fig. 5A and B) than those in the CONTROL group. At the concentrations used, NAM reversed the cognitive deficit induced by the HFS diet, as shown by a progressive reduction in the latencies from Days 2–5 (~0.71, 1.6, 0.75, and 1 time lower, respectively; Fig. 5A and B) compared to those in the HFS group.

The retention stage was performed 48 h after the last training session; on that day, the platform was removed. The CONTROL group rats swam for a long period in the quadrant where the platform had been located, while the HFS group spent less time in the quadrant where the platform had been located (0.6 times less; Fig. 5C) than the CONTROL group. Regarding memory, rats in the HFS-NAM5, 10, and 15 groups

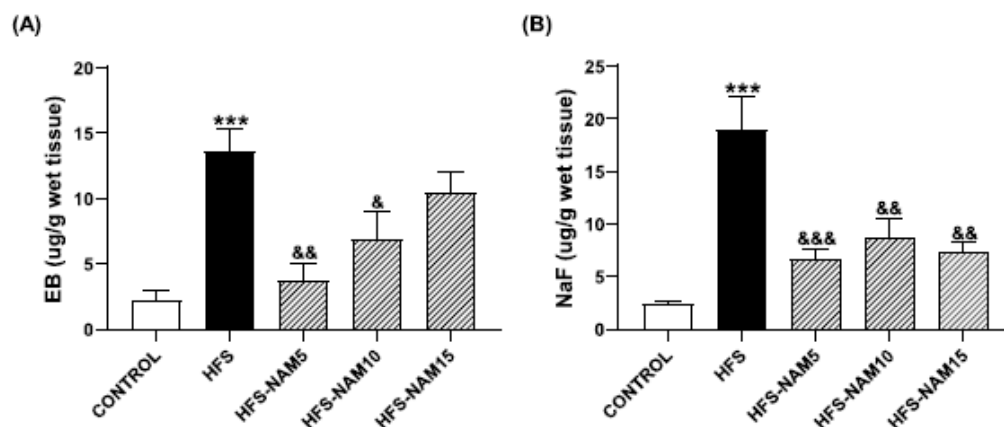


Fig. 4. Effect of NAM on hippocampal BBB permeability in rats fed with HFS diet. (A) EB (Evans Blue) permeability in hippocampus. (B) NaF (Sodium Fluorescein) permeability in hippocampus. Values are expressed as means $\pm$ SEM of 5 animals per group. *** $p < 0.001$ with respect to CONTROL group and $^{\Delta}p < 0.05$, $^{\Delta\Delta}p < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}p < 0.001$ with respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test.

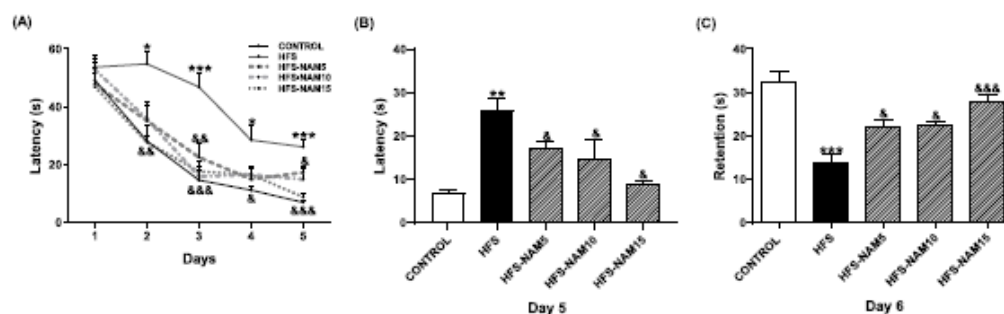


Fig. 5. NAM improves spatial learning and memory in rats fed with HFS diet. (A) Latency (learning) in the Morris water maze on days 1–5. (B) Latency day 5. (C) Retention day 6 (memory). Values are expressed as means $\pm$ SEM of 5 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to CONTROL group and $^{\Delta}p < 0.05$, $^{\Delta\Delta}p < 0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}p < 0.001$ with respect to HFS group. One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test.

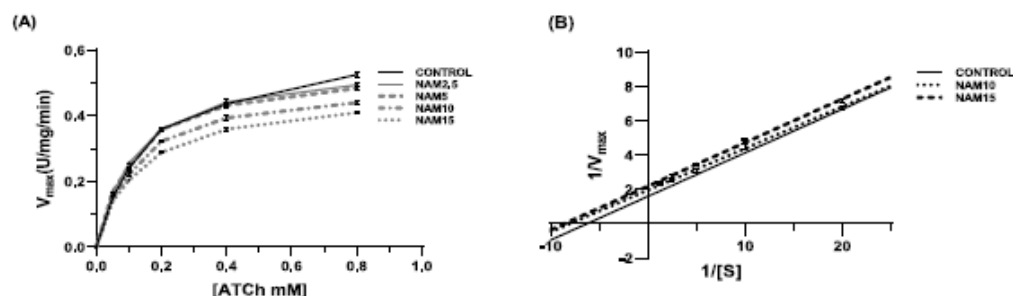


Fig. 6. Inhibition of acetylcholinesterase by NAM in rat hippocampus. (A) Michaelis-Menten plot for AChE at different concentration of acetylthiocholine substrate (ATCh 50–1000 μM) and NAM (2.5–15 mM). (B) Lineweaver-Burk plot for AChE at different concentration of NAM (10 and 15 mM) shows uncompetitive inhibition. The values represent means $\pm$ SEM of 5 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to CONTROL (without NAM). One-way ANOVA analysis with a Tukey's post-hoc test. V_{max} : maximum velocity, K_m : Michaelis-Menten constant, [S]: substrate concentration.

spent more time in the quadrant where the platform had been located (0.6, 0.6, and 1 time higher, respectively; Fig. 5C) than the HFS group.

3.7. NAM is an uncompetitive inhibitor of AChE activity

In Michaelis-Menten kinetics, a decrease in V_{max} of AChE activity dependent on NAM concentration was observed (Fig. 6A), indicating an

inhibitory effect of NAM. This finding was confirmed by the values of the kinetic parameters (V_{max} and K_m) evaluated by means of the Lineweaver-Burk diagram (Fig. 6B), which showed that the K_m and V_{max} decreased from the lowest concentration of NAM (2.5 mM) to the highest (15 mM) with respect to the group without NAM (CONTROL), indicating uncompetitive-type inhibition.

4. Discussion

We found that the glucolipotoxicity generated by the hypercaloric diet led to increased visceral and epididymal fat, reduced muscle mass, BBB disruption and cognitive deficit. The long-term administration of NAM in the drinking water attenuated almost all these alterations. NAM improved insulin sensitivity and antioxidant capacity, reducing IL-6 and decreasing AChE activity through uncompetitive inhibition.

The increased levels of circulating FFA, TG, IL-6, and TNF- α in the HFS group may be a consequence of a combined effect on the liver, adiposity, and insulin resistance. The response to HFS can start when fructose derived from sucrose promotes hepatic fatty acid synthesis and subsequent TG formation, inducing hepatic insulin resistance (Mejia et al., 2018; Loza-Medrano et al., 2020; Villeda-González et al., 2020), as evidenced by HOMA-IR in the HFS group. In addition, serum FFA, produced by lipolysis, promoted lipoperoxidation and an oxidative environment in the HFS group, as shown by increased TBARS and decreased DPPH and GSH/GSSG ratio. The decreased GSH/GSSG ratio suggests an oxidized redox state and the inability to counterbalance the detrimental effects or the highly production of ROS. In addition, increased TBARS and protein carbonyls and decreased antioxidant capacity (DPPH) indicate possible cellular toxicity.

Consumption of hypercaloric diets is associated with metabolic changes, alterations in BBB permeability and cognitive deficit (Pallebage-Gamarallage et al., 2012; Lin et al., 2017). Increased oxidative stress, systemic inflammation, and levels of circulating saturated FFA affect the integrity of the BBB, triggering neuroinflammation and subsequent cognitive impairment (Pugazhenthil et al., 2017; Rhea et al., 2017). In the HFS group, the increases in serum IL-6, TNF- α , TBARS, and FFA were concurrent with cognitive deficit, as indicated by poor spatial learning and memory during the training and retention phases of the Morris water maze test. TBARS, particularly 4-hydroxy-nonenal and malondialdehyde, are byproducts of lipid oxidation due to an increase in free radicals. Higher ROS levels in the central nervous system (CNS) are one of the main determinants of cognitive dysfunction (Roy et al., 2021).

Moreover, the consumption of a hypercaloric diet increased hippocampal BBB permeability, TBARS concentration and protein carbonyls while decreasing the antioxidant capacity and GSH/GSSG ratio. The increase in BBB permeability suggests the free passage of ions and proteins to the brain parenchyma (Ogata et al., 2019). These results are consistent with the finding that hypercholesterolaemic or high saturated fat diets induce dysfunction in the BBB and trigger glial activation in the hippocampus and cerebral cortex in rodents (D'Alonzo et al., 2020; Li et al., 2021). Systemic oxidative stress was demonstrated by high serum levels of protein carbonyls and TBARS, as well as low antioxidant capacity (DPPH) and a decreased GSH/GSSG ratio. Thus, this systemic oxidative stress affects the integrity of the BBB probably by oxidizing the tight junction proteins, increasing permeability and leading to local increases in proinflammatory cytokines and FFA in different brain regions (Tucsek et al., 2014; Elahy et al., 2015). In this sense, our results indicate that the HFS diet increased oxidative stress and inflammation in the hippocampus, affecting memory and learning. Under normal conditions, the transit of molecules through the BBB occurs selectively by transporters (Liu and Liu, 2014). However, the alteration of tight junctions triggers an uncontrolled passage of metabolites, which eventually alter the brain parenchyma (Ogata et al., 2019).

On the other hand, increased activity of serum cholinesterases induced by dietary carbohydrates has been previously reported (Villeda-González et al., 2020). This increased activity probably causes higher hydrolysis of acetylcholine, preventing its anti-inflammatory activity and favouring systemic inflammation. It has been described that acetylcholine binding to the nicotinic receptor in macrophages exerts anti-inflammatory effects, avoiding the production and release of proinflammatory cytokines (Shenhar-Tsarfaty et al., 2015). The same mechanism may occur in the CNS, since the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor is found mainly in astrocytes (Aryal et al., 2021). The reduction

in acetylcholine levels exacerbates neuroinflammation, favouring cognitive decline (Gamage et al., 2020). The increased activity of AChE and BChE in the hippocampus of the HFS group can induce decreased hippocampal levels of acetylcholine, resulting in cognitive deficit. Changes in cholinesterase glycosylation may explain differences in activity in the HFS group. Previous reports have shown that a HFD leads to an overactivation of sialidases, which remove sialic acid from glycoproteins, including AChE and BChE, inducing inflammation and steatosis (Pilling et al., 2021). The increased activity of these enzymes can expand the vulnerability of regions that are important for learning and memory, as we found in this study.

NAM decreased the accumulation of adipose tissue; TG, FFA, insulin and IL-6 levels in serum; and improved C-HDL concentration and glucose metabolism in HFS rats. In the serum and hippocampus, NAM regulated cholinesterase activity and antioxidant capacity (DPPH) and decreased TBARS and protein carbonyls in HFS rats. Additionally, NAM decreased BBB permeability and increased the GSH/GSSG ratio in the hippocampus of HFS rats. By regulating the alterations in both the serum and hippocampus, NAM exerted a protective effect that attenuated the cognitive deficit produced by the consumption of a hypercaloric diet.

Since NAM is a precursor of the coenzymes NAD⁺, NADH, NADP⁺, and NADPH, it has been considered an anti-inflammatory and antioxidant, and it also increases ATP production and influences cellular metabolism (Song et al., 2019). Additionally, NAM has a protective effect against diet-induced obesity by improving the efficiency of energy expenditure through its ability to increase NAD⁺ levels and mitochondrial activity in adipose tissue, resulting in increased fatty acid oxidation and decreased adipose tissue storage (Luo et al., 2022). These actions of NAM translate into the prevention of hepatic steatosis and reduced inflammation and glucose intolerance (Mejia et al., 2018; Méndez-Lara et al., 2021). In addition, in this study, NAM prevented muscle mass loss in the quadriceps of rats fed a hypercaloric diet, which confirmed the protective effect of NAM on muscle mass. Thus, it could be a potential treatment for muscle atrophy, as NAM decreases FFA, inflammation and oxidative stress, preventing the loss of muscle proteins. Previous studies have reported that the administration of NAM reduces glucose levels, decreases ROS, induces the activity of antioxidant enzymes (Singh and Bodakhe, 2021) and regulates the sirtuin pathway, improving mitochondrial biogenesis in diabetic rats treated with a high-fat diet (Yang et al., 2014).

In our study, NAM decreased the concentrations of IL-6 and the activity of cholinesterases in serum. The anti-inflammatory effect of NAM is exerted through the increase in the concentrations of NAD⁺, which is used as a substrate for a group of histone deacetylase enzymes known as sirtuins, causing an increase in their activity, and inhibiting the formation of the nuclear factor kappa B complex. In parallel, it is possible that the reduction in the activity of cholinesterases by NAM attenuates acetylcholine hydrolysis, maintaining the anti-inflammatory cholinergic pathway and thus preventing the synthesis and release of proinflammatory cytokines (Pugazhenthil et al., 2017).

Furthermore, the antioxidant effect of NAM was demonstrated through the restoration of the GSH/GSSG ratio in the hippocampus, which prevented the deleterious effect of ROS on neuronal metabolism and cognitive function (Fricker et al., 2018), probably due to the availability of NADPH by NAM-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes (Loza-Medrano et al., 2020). NADPH is used in the recycling of GSH from GSSG by glutathione reductase, leading to an increase in cellular antioxidant capacity that reduces oxidative stress (Turunc Bayrakdar et al., 2014). This antioxidant action is evidenced by the low concentrations of TBARS, prevention of protein oxidation, and restoration of the GSH/GSSG ratio in the serum and hippocampus. NAM increases ATP concentrations by increasing the concentration of NAD⁺, which is required for the formation of NADH, which in turn drives the synthesis of ATP by the mitochondrial electron transport chain (Guo et al., 2019).

Oxidative stress and low concentrations of ATP are the main causes of neurodegenerative diseases associated with cognitive deficit (Vilela et al., 2023). Increased oxidative stress correlates with an increase in cholinesterase activity, contributing to lower acetylcholine concentrations and affecting synapses and cognitive processes (Gao et al., 2022). Various molecules with antioxidant and anti-inflammatory properties have been used to decrease the activity of cholinesterases. These data show that regulating oxidative stress is key for the proper function of the ensuing cholinergic pathway and the restoration of brain synapses (Yamini et al., 2022). Although cholinesterase inhibitors are currently used to increase acetylcholine levels (Alhazmi and Albratty, 2022), they have not been completely effective since oxidative stress persists under pathological conditions (Simunkova et al., 2019). The present study supports the idea that NAM may be a powerful neuroprotector by preventing BBB dysfunction and therefore cognitive deficit, reducing cholinesterase activity, inflammation and oxidative stress, and increasing the antioxidant capacity in the hippocampus.

A direct uncompetitive inhibitory action of NAM on cholinesterases was found by an enzyme kinetics study performed *in vitro* in hippocampal homogenates. Similar results showed that NAM derivatives reversibly inhibit the activities of AChE and BChE because they have greater affinity for the active site of AChE (Zandona et al., 2020). This was also confirmed by molecular docking studies (Villeda-González et al., 2020).

5. Conclusion

NAM has significant neuroprotective potential against cognitive damage caused by the consumption of a hypercaloric diet; NAM modulates cholinesterase activities, especially that of AChE, and reduces inflammation and oxidative stress.

Author Contribution to Study

A. Ramírez-Cruz: Investigation, Writing – original draft, Visualization, Conceptualization, Formal analysis, B. Gómez-González: Methodology, Conceptualization, Validation, Resources, L.A. Baiza-Gutman: Writing – review & editing, L. Manuel-Apolinar: Resources, Writing – review & editing, S. Ángeles-Mejía: Methodology, Investigation, S.P. López-Cervantes: Investigation, C. Ortega-Camarillo: Validation, M. Cruz-López: Resources, J.L. Gómez-Olivares: Methodology, Resources, Supervision, M. Díaz-Flores: Methodology, Conceptualization, Validation, Writing – original draft, Supervision, Visualization, Resources, Project administration Structured

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The present research was carried out thanks to CONACYT, for having granted scholarship 638428 to Armando Ramírez-Cruz for being a PhD student at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

References

- Alhazmi, H.A., Albratty, M., 2022. An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharmaceut. J.* 30 (12), 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.10.004>.
- Alzoubi, K.H., Khabour, O.F., Al-Awad, R.M., Aburashed, Z.O., 2021. Every-other day fasting prevents memory impairment induced by high fat-diet: role of oxidative stress. *Physiol. Behav.* 229, 113263 <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113263>.
- Aryal, S.P., Fu, X., Sandin, J.N., Neupane, K.R., Lakes, J.E., Grady, M.E., Richards, C.L., 2021. Nicotine induces morphological and functional changes in astrocytes via nicotinic receptor activity. *Glia* 69 (8), 2037–2053. <https://doi.org/10.1002/glia.24011>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Chang, E.H., Chavan, S.S., Pavlov, V.A., 2019. Cholinergic control of inflammation, metabolic dysfunction, and cognitive impairment in obesity-associated disorders: mechanisms and Novel Therapeutic Opportunities. *Front. Neurosci.* 13, 263. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00263>.
- D'Alonzo, Z., Lam, V., Nesbitt, M., Graneri, L., Takechi, R., Mamo, J.C., 2020. Chronic consumption of bovine dairy milk attenuates dietary saturated fatty acid-induced blood-brain barrier dysfunction. *Front. Nutr.* 7, 58. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00058>.
- de Paula, G.C., Brunetta, H.S., Engel, D.F., Gaspar, J.M., Velloso, L.A., Engholm, D., de Oliveira, J., de Bem, A.F., 2021. Hippocampal function is impaired by a short-term high-fat diet in mice: increased blood-brain barrier permeability and neuroinflammation as triggering events. *Front. Neurosci.* 15, 734158. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.734158>.
- Duchnowicz, P., Ziobro, A., Rapacka, E., Koter-Michalak, M., Bukowska, B., 2018. Changes in cholinesterase activity in blood of adolescent with metabolic syndrome after supplementation with extract from *Aronia melanocarpa*. *BioMed Res. Int.* 2018, 5670145. <https://doi.org/10.1155/2018/5670145>.
- Elahy, M., Lam, V., Pallebage-Gamarallage, M.M., Giles, C., Mamo, J.C., Takechi, R., 2015. Nicotine attenuates disruption of blood-brain barrier induced by saturated-fat feeding in wild-type mice. *Nicotine Tob. Res.: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 17 (12), 1436–1441. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntv044>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Fricker, R.A., Green, E.L., Jenkins, S.L., Griffin, S.M., 2018. The influence of nicotinamide on health and disease in the central nervous system. *Int. J. Tryptophan Res.: IJTR* 11, 1178646918776658. <https://doi.org/10.1177/1178646918776658>.
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., Kawashima, K., 2017. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front. Immunol.* 8, 1085. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01085>.
- Galley, J.C., Straub, A.C., 2017. Redox control of vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (12), e178–e184. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309945>.
- Game, R., Wagnon, L., Rossetti, L., Childs, R., Niedermayer, G., Chesworth, R., Gyengesi, E., 2020. Cholinergic modulation of glial function during aging and chronic neuroinflammation. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 577912. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577912>.
- Gao, Y., Xu, Y., Yin, J., 2022. Selenomethionine ameliorates cognitive impairment, decreases hippocampal oxidative stress and attenuates dysbiosis in D-galactose-treated mice. *Antioxidants* 11 (1), 111. <https://doi.org/10.3390/antiox11010111>.
- Guo, S., Chen, Q., Sun, Y., Chen, J., 2019. Nicotinamide protects against skeletal muscle atrophy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Arch. Physiol. Biochem.* 125 (5), 470–477. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1638414>.
- Haddad, M., Hervé, V., Ben Khedher, M.R., Rabanel, J.M., Ramassamy, C., 2021. Glutathione: an old and small molecule with great functions and new applications in the brain and in Alzheimer's disease. *Antioxidants Redox Signal.* 35 (4), 270–292. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8129>.
- Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20 (2), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02043-8).
- Kanowski, S.E., Zhang, Y., Zheng, W., Davidson, T.L., 2010. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J. Alzheim. Dis.* 21 (1), 207–219. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091414>.
- Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A., 2006. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9 (1), 101–124. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005833>.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6875\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6875(90)86141-h).
- Li, C., Shi, L., Wang, Y., Peng, C., Wu, L., Zhang, Y., Du, Z., 2021. High-fat diet exacerbates lead-induced blood-brain barrier disruption by disrupting tight junction integrity. *Environ. Toxicol.* 36 (7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1002/tox.23137>.

- 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 stearyl-CoA desaturase, and spatial memory deficits in rats. *Nutrients* 9 (6), 619. <https://doi.org/10.3390/nu9060619>.
- Liu, L., Liu, X.D., 2014. Alterations in function and expression of ABC transporters at blood-brain barrier under diabetes and the clinical significances. *Front. Pharmacol.* 5, 273. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00273>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275. PMID: 14907713.
- Loza-Medrano, S.S., Baiza-Gutman, L.A., Manuel-Apolinar, L., García-Macedo, R., Damasio-Santana, L., Martínez-Mar, O.A., Sánchez-Becerra, M.C., Cruz-López, M., Ibáñez-Hernández, M.A., Díaz-Flores, M., 2020. High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes. *Mol. Biol. Rep.* 47 (1), 337–351. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05136-4>.
- Luo, C., Yang, C., Wang, X., Chen, Y., Liu, X., Deng, H., 2022. Nicotinamide reprograms adipose cellular metabolism and increases mitochondrial biogenesis to ameliorate obesity. *J. Nutr. Biochem.* 107, 109056 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109056>.
- Malase, K., 2021. Nicotinamide as a foundation for treating neurodegenerative disease and metabolic disorders. *Curr. Neurovascul. Res.* 18 (1), 134–149. <https://doi.org/10.2174/1567202617999210104220334>.
- Mandal, P.K., Saharan, S., Tripathi, M., Murari, G., 2015. Brain glutathione levels—a novel biomarker for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatr.* 78 (10), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.005>.
- Mejía, S.A., Gutman, L., Camarillo, C.O., Navarro, R.M., Becerra, M., Santana, L.D., Cruz, M., Pérez, E.H., Flores, M.D., 2018. Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. *Eur. J. Pharmacol.* 818, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.048>.
- Méndez-Lara, K.A., Rodríguez-Millán, E., Sebastián, D., Blanco-Soto, R., Camacho, M., Nan, M.N., Diarte-Añazco, E., Mato, E., Lope-Piedrafita, S., Roglans, N., Laguna, J.C., Alonso, N., Mauricio, D., Zorzano, A., Villarroya, F., Villena, J.A., Blanco-Vaca, F., Julve, J., 2021. Nicotinamide protects against diet-induced body weight gain, increases energy expenditure, and induces white adipose tissue beiging. *Mol. Nutr. Food Res.* 65 (11), e2100111 <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100111>.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11 (1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Ogata, S., Ito, S., Masuda, T., Ohtsuki, S., 2019. Changes of blood-brain barrier and brain parenchymal protein expression levels of mice under different insulin-resistance conditions induced by high-fat diet. *Pharmacol. Res.* 36 (10), 141. <https://doi.org/10.1007/s10995-019-2674-8>.
- Pallebage-Gamarallage, M., Lam, V., Takechi, R., Galloway, S., Clark, K., Mamo, J., 2012. Restoration of dietary-fat induced blood-brain barrier dysfunction by anti-inflammatory lipid-modulating agents. *Lipids Health Dis.* 11, 117. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-117>.
- Pilling, D., Karhadkar, T.R., Gomer, R.H., 2021. High-fat diet-induced adipose tissue and liver inflammation and steatosis in mice are reduced by inhibiting sialidases. *Am. J. Pathol.* 191 (1), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.011>.
- Pugazhenth, S., Qin, L., Reddy, P.H., 2017. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (5), 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.04.017>.
- Rhea, E.M., Salameh, T.S., Logsdon, A.F., Hanson, A.J., Erickson, M.A., Banks, W.A., 2017. Blood-brain barriers in obesity. *AAPS J.* 19 (4), 921–930. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0079-3>.
- Roy, P., Martinelli, L., Moruzzi, M., Maggi, F., Amantini, C., Micioni Di Bonaventura, M. V., Cifani, C., Amenta, F., Tayebati, S.K., Tomassoni, D., 2021. Ion channels alterations in the forebrain of high-fat diet fed rats. *Eur. J. Histochem.: EJH* 65 (s1), 3305. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3305>.
- Sajja, R.K., Rahman, S., Cucullo, L., 2016. Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: a focus on the role of oxidative stress. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 36 (3), 539–554. <https://doi.org/10.1177/0271678X15616978>.
- Shenhar-Tsarfaty, S., Sherf-Dagan, S., Berman, G., Webb, M., Raziel, A., Keidar, A., Goitein, D., Sakran, N., Zwang, E., Shapira, L., Zeltser, D., Berliner, S., Rogowski, O., Shibolet, O., Zilber-Sagi, S., 2019. Obesity-related acetylcholinesterase elevation is reversed following laparoscopic sleeve gastrectomy. *Int. J. Obes.* 43 (2), 297–305. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0014-4>.
- Shenhar-Tsarfaty, S., Yayon, N., Waiskopf, N., Shapira, L., Tokar, S., Zeltser, D., Berliner, S., Ritov, Y., Soreq, H., 2015. Fear and C-reactive protein co-synergize annual pulse increases in healthy adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (5), E467–E471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418264112>.
- Silveyra, M.X., Cuadrado-Corralles, N., Marcos, A., Barquero, M.S., Rabano, A., Calero, M., Sáez-Valero, J., 2006. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurochem.* 96 (1), 97–104. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03514.x>.
- Simunkova, M., Alwasel, S.H., Alhazza, L.M., Jomova, K., Kollar, V., Ruzsko, M., Valko, M., 2019. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Arch. Toxicol.* 93 (9), 2491–2513. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02538-y>.
- Singh, A., Bodakhe, S.H., 2021. Biochemical evidence indicates the preventive effect of resveratrol and nicotinamide in the treatment of STZ-induced diabetic cataract. *Curr. Eye Res.* 46 (1), 52–63. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1782941>.
- Song, S.B., Park, J.S., Chung, G.J., Lee, L.H., Hwang, E.S., 2019. Diverse therapeutic efficacies and more diverse mechanisms of nicotinamide. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* 15 (10), 137. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1604-4>.
- Tarantini, S., Valcarcel-Ares, M.N., Toth, P., Yabluchanskiy, A., Tuscsek, Z., Kiss, D., Hertelendy, P., Kinter, M., Ballabh, P., Süle, Z., Farkas, E., Baur, J.A., Sinclair, D.A., Csizsar, A., Ungvari, Z., 2019. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation rescues cerebrovascular endothelial function and neurovascular coupling responses and improves cognitive function in aged mice. *Redox Biol.* 24, 101192 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101192>.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27 (3), 502–522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90036-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90036-9).
- Tuscsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gantam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z., Csizsar, A., 2014. Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *The J. Gerontol. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 (10), 1212–1226. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt177>.
- Turunc Bayraktar, E., Uyanikgil, Y., Kanit, L., Koylu, E., Yalcin, A., 2014. Nicotinamide treatment reduces the levels of oxidative stress, apoptosis, and PARP-1 activity in Aβ (1–42)-induced rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* 48 (2), 146–158. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.857018>.
- Villeda-González, J.D., Gómez-Olivares, J.L., Baiza-Gutman, L.A., Manuel-Apolinar, L., Damasio-Santana, L., Millán-Pacheco, C., Ángeles-Mejía, S., Cortés-Gine, M.C., Cruz-López, M., Vidal-Moreno, C.J., Díaz-Flores, M., 2020. Nicotinamide reduces inflammation and oxidative stress via the cholinergic system in fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Life Sci.* 250, 117585 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117585>.
- Vilela, W.R., Bellozi, P.M.Q., Picolo, V.L., Cavadas, B.N., Marques, K.V.S., Pereira, L.T.G., Guirao, A.R.Y., Amato, A.A., Magalhães, K.G., Mortari, M.R., Medel, E.H., Goulart, J. T., de Bem, A.F., 2023. Early-life metabolic dysfunction impairs cognition and mitochondrial function in mice. *J. Nutr. Biochem.* 117, 109352 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109352>.
- Xie, X., Gao, Y., Zeng, M., Wang, Y., Wei, T.F., Lu, Y.B., Zhang, W.P., 2019. Nicotinamide ribose ameliorates cognitive impairment of aged and Alzheimer's disease model mice. *Metab. Brain Dis.* 34 (1), 353–366. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0346-8>.
- Yamini, P., Ray, R.S., Yadav, S., Dhaliwal, J., Yadav, M., Kondepudi, K.K., Chopra, K., 2022. αnAChR activation protects against oxidative stress, neuroinflammation and central insulin resistance in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 217, 173402 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173402>.
- Yang, S.J., Choi, J.M., Kim, L., Park, S.E., Rhee, E.J., Lee, W.Y., Oh, K.W., Park, S.W., Park, C.Y., 2014. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *J. Nutr. Biochem.* 25 (1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.004>.
- Yang, W., Shi, H., Zhang, J., Shen, Z., Zhou, G., Hu, M., 2017. Effects of the duration of hyperlipidemia on cerebral lipids, vessels and neurons in rats. *Lipids Health Dis.* 16 (1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0401-6>.
- Zandona, A., Lihtar, G., Maraković, N., Miš, K., Bušić, V., Gašo-Sokač, D., Pirkmajer, S., Katalinić, M., 2020. Vitamin B3-based biologically active compounds as inhibitors of human cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (21), 8088. <https://doi.org/10.3390/ijms21218088>.
- Zivkovic, A.R., Schmidt, K., Sigl, A., Decker, S.O., Brenner, T., Hofer, S., 2015. Reduced serum butyrylcholinesterase activity indicates severe systemic inflammation in critically ill patients. *Mediat. Inflamm.* 2015, 274607 <https://doi.org/10.1155/2015/274607>.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00156

Matricula: 2173801684

Efecto protector de nicotinamida sobre la integridad de la barrera hematoencefálica y el déficit cognitivo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR
DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: ARMANDO RAMIREZ CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ARMANDO RAMIREZ CRUZ
ALUMNO

REVISÓ

MTA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR

VOCAL

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

SECRETARIA

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES