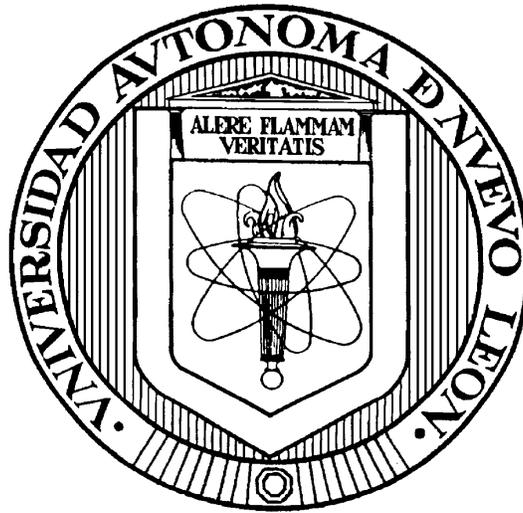


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“PAPEL DE LAS MEMBRANAS ASOCIADAS A LA MITOCONDRIA EN LA
SENSIBILIDAD A LA INSULINA CEREBRAL EN UN MODELO DE OBESIDAD EN
ROEDORES”**

PRESENTADO POR:

QCB. BRENDA ELIZABETH DÍAZ SALINAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

NOVIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“PAPEL DE LAS MEMBRANAS ASOCIADAS A LA MITOCONDRIA EN LA
SENSIBILIDAD A LA INSULINA CEREBRAL EN UN MODELO DE OBESIDAD EN
ROEDORES”**

PRESENTADO POR:

QCB. BRENDA ELIZABETH DÍAZ SALINAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

NOVIEMBRE DE 2014

DEDICATORIA

A **Dios** por cada una de sus bendiciones y por permitirme culminar el día de hoy esta etapa de mi vida

A **mis Padres** por el gran apoyo incondicional que siempre me han brindado desde pequeña, por su amor, sus regaños y por enseñarme día con día el valor del estudio y la importancia de ser siempre una mejor profesional y sobre todo una mejor persona.

A **mi Esposo** por el amor y el apoyo que siempre me ha dado e incluso por la paciencia que me ha tenido en mis días de mayor estrés laboral, por sus consejos, su ayuda y por siempre estar ahí cuando más lo necesito.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. C. Alberto Camacho Morales**, le agradezco por darme la oportunidad de formar parte de uno de sus proyectos de investigación y por la confianza que siempre depositó en mí. Gracias por todos sus consejos, sugerencias, por todas sus enseñanzas e incluso por todos sus regaños, todos y cada uno de ellos, me ayudaron a mejorar día con día y a convertirme en la profesional en investigación que soy ahora. Gracias por contagiarme el gusto por la Neurociencia.

A la **Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez**, agradezco su amabilidad y su disposición en apoyarme a lo largo del proyecto de tesis. Gracias por sugerencias y comentarios durante las exposiciones de mi trabajo que enriquecieron en gran medida mis conocimientos y contribuyó al mejoramiento de mi tesis. Y por su puesto agradezco la oportunidad que me brindó para ingresar al curso de Maestría en Ciencias.

Al **Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez**, gracias por cada uno de sus consejos, tanto en el desarrollo técnico de mi trabajo como en la realización del mismo. Le agradezco su ayuda y su paciencia en la enseñanza del uso de los aparatos de laboratorio, además de la confianza depositada en mí. Gracias por su buen humor, que lograba que todos los días de trabajo fueran más alegres.

Al **Dr. Carlos Medina de la Garza**, por su apoyo y la oportunidad de realizar gran parte del proyecto de tesis en el **Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS**.

A la **Dra. C. Ilse Delint Ramírez**, gracias por sus conocimientos en el área de neurociencias que ayudaron en la parte inicial de mi proyecto de tesis. Le agradezco cada uno de sus consejos y sugerencias en la parte experimental de este trabajo.

A los **Dr. C. Ana María Rivas, Jorge Ascacio, Francisco Velázquez y Carlos Córdova**, por todos sus comentarios, sugerencias y el interés que demostraron en mi trabajo que ayudó en gran parte al mejoramiento del mismo.

A los **Dr. C. Augusto Rojas y Rocío Ortiz**, por prestarnos parte de sus instalaciones y equipos de laboratorio para la realización de experimentos. Gracias por su amabilidad.

A los **M.C. Nancy Garza y Owen Bryan**, por la ayuda y el apoyo técnico en algunos de mis experimentos.

A mis compañeros del **Laboratorio de Bioimagen** en el **CIDICS**, al **QBP. Roger Maldonado**, y a los estudiantes **Walter García y Teresa Ontiveros**, por su colaboración, ayuda y compañerismo dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis **profesores de Posgrado**, gracias por estos dos años de compartir sus conocimientos y por su entera disposición en ayudar y resolver todas mis dudas.

A mis **compañeros de maestría**, Yazmín, Rolando, Jesús, Mauricio, Vanessa, Selene, Nidia, Gysela, Guillermo, Carlos, Abraham y Ulrich, gracias por su amistad, su ayuda, su compañerismo y por tantos momentos alegres que compartimos dentro y fuera de la facultad.

Al **personal directivo y administrativo** del **Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular** así como de la **Subdirección de estudios de Posgrado** de esta facultad.

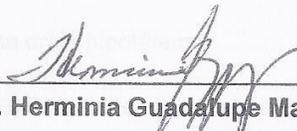
A **CONACYT** por el otorgamiento de la beca durante la realización de los estudios de Maestría.

Papel de las membranas asociadas a la mitocondria en la sensibilidad a la insulina cerebral en un modelo de obesidad en roedores

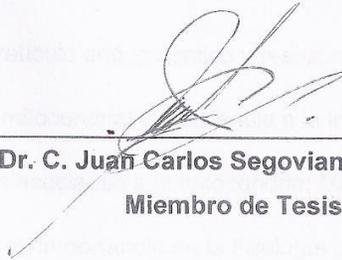
Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Alberto Camacho Morales
Director de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez
Miembro de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector De Estudios De Posgrado

ÍNDICE

	Páginas
Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tablas.....	vi
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Obesidad y diabetes tipo 2.....	2
1.2. Papel de la insulina en el desarrollo de diabetes tipo 2.....	3
1.3. Resistencia a insulina en el hipotálamo.....	5
1.4. Efecto de los lípidos saturados en la resistencia a la insulina.....	7
1.5. Daños subcelulares por acumulación de lípidos saturados en la resistencia a la insulina.....	7
1.5.1. Estrés del retículo endoplásmico y resistencia a la insulina..	7
1.5.2. Disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina.....	10
1.5.3. Membranas asociadas a la mitocondria: MAM's.....	12
1.6. La Mitofusina 2 y su importancia en la fisiología de la célula.....	13
1.7. Papel de la Mitofusina 2 en la generación de diabetes durante la obesidad	13
2. Justificación.....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	16

	Páginas
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos específicos.....	16
5. Material y métodos.....	17
5.1. Material.....	17
5.2. Modelo <i>in vitro</i>	20
5.2.1. Cultivo celular.....	20
5.2.2. Preparación de ácido palmítico, ácido palmitoleico e insulina	21
5.2.3. Viabilidad celular, ensayos ATP (Trifosfato de Adenosina)	
y MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)...	21
5.2.4. Cultivo de células y tratamiento con lípidos para análisis por	
<i>Western Blot</i>	22
5.2.5. Procesamiento de muestras y análisis por <i>Western Blot</i>	23
5.3. Modelo <i>in vivo</i>	25
5.3.1. Cuidado de ratones, dietas y sacrificio.....	26
5.3.2. Procesamiento de cerebros y análisis por <i>Western Blot</i>	26
5.4. Análisis estadístico.....	27
6. Resultados.....	30
6.1. <i>In vitro</i>	30
6.1.1. Viabilidad celular.....	30

	Páginas
6.1.2. Tratamiento de células con lípidos para análisis por <i>Western Blot</i> para Mitofusina 2 y BIP (GRP78).....	32
6.1.3. Tratamiento de células con lípidos para análisis por <i>Western blot</i> para FserAKT (Fosforilación en serina 473 de la proteína cinasa B) y AKT total (Proteína cinasa B total).....	40
6.2. <i>In vivo</i>	42
6.2.1. Fenotipo obeso en ratones.....	42
6.2.2. <i>Western Blot</i> de muestras de hipotálamo de ratón para Mitofusina 2.....	46
7. Discusión	50
7.1 <i>In vitro</i>	50
7.2. <i>In vivo</i>	53
8. Conclusión	55
9. Perspectivas	56
9.1. Primera perspectiva.....	56
10. Referencias	58

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
IMC	Índice de Masa Corporal
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DM	Diabetes Mellitus
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinasa
AKT	Proteína cinasa B
FserAKT	Fosforilación en serina de la proteína cinasa B
PIP ₂	Fosfatidil Inositol 4,5 Bifosfato
PIP ₃	Fosfatidil Inositol 3,4,5 Trifosfato
IRS	Sustrato receptor de insulina
RI	Resistencia a Insulina
JNK	Cinasa c-jun N terminal
SNC	Sistema Nervioso Central
POMC	Proopiomelanocortina
AgRP	Proteína r-agouti
UPR	Respuesta a proteínas plegadas incorrectamente (siglas en inglés)
RE	Retículo Endoplásmico
BIP	Chaperona GRP78
IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor-6</i>
XBP1	<i>Xbox binding protein 1</i>

eIF2 α	Factor de inicio de la transcripción 2 alfa
ATP	Trifosfato de Adenosina
MFN	Mitofusina
MFN2	Mitofusina 2
MAMs	Membranas asociadas a la mitocondria
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
BSA	Albúmina bovina sérica (por sus siglas en inglés)
SFB	Suero fetal bovino
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
D.O.	Densidad Óptica
SD	Desviación estándar (por sus siglas en inglés)

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Obesidad a nivel mundial de acuerdo a la OMS (2012).....	2
Figura 2. Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina en la etapa postprandial.....	4
Figura 3. Mecanismos moleculares que promueven resistencia a insulina	5
Figura 4. Estrés de retículo endoplásmico.....	9
Figura 5. Fosforilación oxidativa.....	11
Figura 6. Propuesta de proyecto.....	15
Figura 7. Estrategia general <i>in vitro</i>	20
Figura 8. Estrategia general <i>in vivo</i>	25
Figura 9. Alimentación de ratones.....	28
Figura 10. Comparación ratones obesos y controles (1 mes y 3 meses).....	28
Figura 11. Obtención del hipotálamo.....	29
Figura 12. % de Reducción de MTT.....	30
Figura 13. % de Síntesis de ATP.....	31
Figura 14. <i>Western Blot</i> de Mfn2 y Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	32

	Páginas
Figura 15. Gráfica de la D.O. de la Mfn2/Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	33
Figura 16. <i>Western Blot</i> de BIP y Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	34
Figura 17. Gráfica de la D.O. de la BIP/Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	35
Figura 18. <i>Western Blot</i> de Mfn2 y Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	36
Figura 19. Gráfica de la D.O. Mfn2/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	37
Figura 20. <i>Western Blot</i> de BIP y Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	38
Figura 21. Gráfica de la D.O. BIP/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	39
Figura 22. <i>Western Blot</i> de FserAKT/AKT total/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	40
Figura 23. Gráfica de la D.O. de la FserAKT/AKT total/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.	41
Figura 24. Gráfica de peso (g) por semana. Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control).....	43

	Páginas
Figura 25. Gráfica de glucosa (mg/dL). Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control).....	44
Figura 26. Gráfica de Insulina (ng/mL) y colesterol (mg/dL) . Grupo de ratones de 3 meses.....	45
Figura 27. <i>Western Blot</i> de Mfn2 y Actina del núcleo arcuato . Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control).....	46
Figura 28. Gráfica de la D.O. de la Mfn2/Actina del núcleo arcuato . Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control)	47
Figura 29. <i>Western Blot</i> de Mfn2 y Actina del núcleo dorsomedial. Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control)	48
Figura 30. Gráfica de la D.O. de la Mfn2/Actina del núcleo arcuato . Grupos de ratones 1 mes y 3 meses (dieta alta en grasa y dieta control)	49
Figura 31. Esquema de resultados in vitro.....	53
Figura 32. Perspectiva 1.....	56

LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. % de Reducción de MTT.....	30
Tabla 2. % de Síntesis de ATP.....	31
Tabla 3. D.O. de Mfn2/Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	33
Tabla 4. D.O. de BIP/Actina. Tratamiento con ácido palmítico.....	35
Tabla 5. D.O. de Mfn2/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	37
Tabla 6. D.O. de BIP/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	39
Tabla 7. D.O. de FserAKT/AKT total/Actina. Tratamiento con ácido palmítico y ácido palmitoleico a diferentes horas.....	41
Tabla 8. Peso (g) por semana de ratones del grupo de 1 mes.....	42
Tabla 9. Peso (g) por semana de ratones del grupo de 3 meses.....	42
Tabla 10. Glucosa (mg/dL). Grupo de ratones 1 mes y 3 meses.....	44
Tabla 11. D.O. de Mfn2/Actina del núcleo arcuato.....	47
Tabla 12. D.O. de Mfn2/Actina del núcleo dorsomedial.....	48

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad que afecta a millones de personas alrededor del mundo. Se estima que el 70% de las personas que presentan obesidad desarrollarán diabetes tipo 2. En los últimos años se ha destacado la participación del hipotálamo, en la coordinación de la homeostasis de glucosa y balance energético corporal. Se conoce que similar a lo que sucede en los órganos periféricos, el cerebro presenta resistencia a insulina (RI). A nivel molecular se sabe que el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria participan en la sensibilidad a la insulina. En el contexto de obesidad ambos organelos se afectan por la acumulación de ácido palmítico, favoreciendo el desarrollo de RI. Ambos organelos interactúan a través de una región conocida como membranas asociadas a la mitocondria (MAMs) en donde reside la proteína Mitofusina 2 (Mfn2). La Mfn2 participa en la fusión mitocondrial e interactúa funcionalmente con el RE y la mitocondria. La delección del gen de la Mfn2 en ratones promueve estrés de RE y disfunción mitocondrial conllevando a alteraciones metabólicas y RI en hígado, músculo esquelético y en hipotálamo. Se propone que la integridad de las MAM's se ve afectada por la acumulación de lípidos en esa región. Por lo que la propuesta de este trabajo es que la acumulación de lípidos saturados en esta región disminuye los niveles de la proteína Mfn2 causando alteraciones metabólicas tales como estrés de RE y disfunción de la mitocondria conllevando así a RI. **Resultados.** *In vitro*- el ácido palmítico afecta la viabilidad celular a una concentración de 500 μ M y a 250 μ M se produce disminución en los niveles de la Mfn2 y un incremento aparente en el estrés de RE a las 12 h de estimulación. A esta misma concentración hay RI a 6 h de estimulación tanto con el ácido palmítico como con el palmitoleico, sin embargo a las 12 h el ácido palmítico produce un incremento en la RI. *In vivo* - la dieta alta en grasa durante 3 meses produce obesidad y diabetes, sin embargo no parece producir un efecto en los niveles de la Mfn2 en ambos núcleos del hipotálamo. **Discusión y Conclusiones.** La diferencia de una insaturación del ácido palmitoleico con respecto al palmítico es suficiente para reducir los niveles de la Mfn2 y producir estrés de RE, tal efecto contribuye en gran parte a la RI presentada. Los resultados de los modelos *in vivo* rechazan la hipótesis propuesta y suponen que la edad adulta puede contribuir en la disminución de la Mfn2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Obesidad y Diabetes tipo 2

La obesidad es una enfermedad metabólica considerada como un componente importante en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas a nivel mundial [1]. Países occidentales en especial Estados Unidos de América, contribuyen en su mayoría al incremento de la obesidad a nivel mundial. En México la obesidad ha adquirido cada vez mayor importancia debido a que hasta el año 2012, se reportaron 80 millones de personas afectadas, de las cuales 70% presentaban sobrepeso y 30% obesidad [2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó recientemente que de acuerdo al índice de masa corporal (IMC), México ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial con problemas de obesidad, con un IMC de 30.0 a 40.0 [3]. (Figura 1).

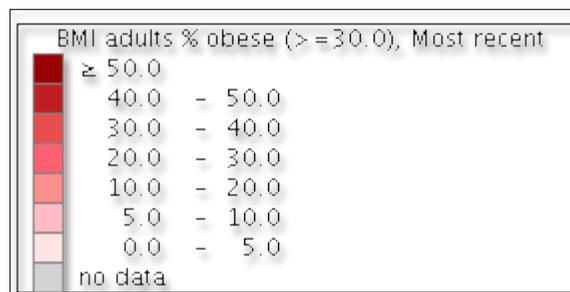
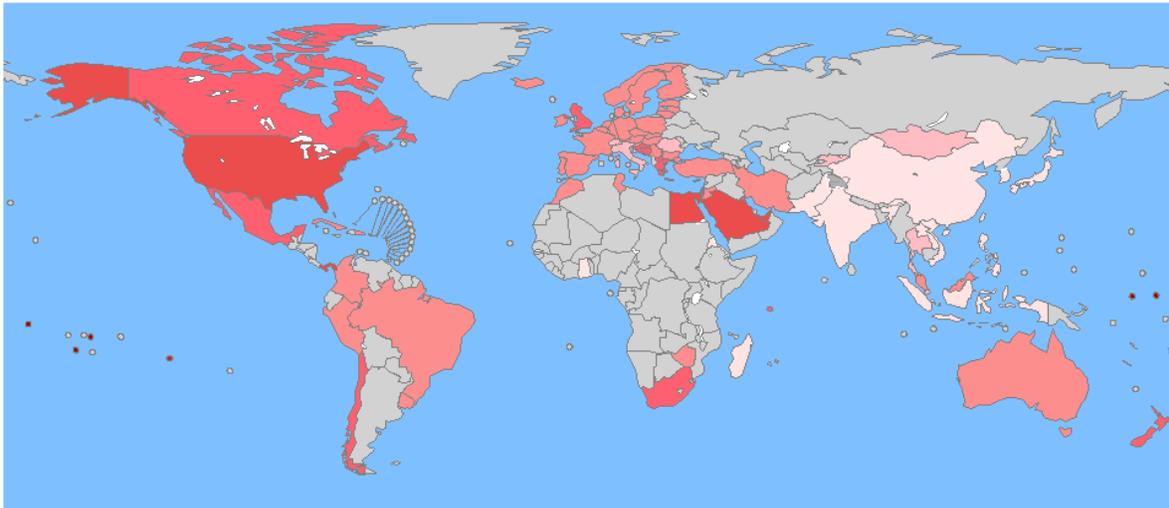


Figura 1. IMC (BMI, por sus siglas en inglés) a nivel mundial de acuerdo a la OMS (2012).

En este sentido, se conoce que la adiposidad excesiva es un factor de riesgo importante de morbilidad y mortalidad para enfermedades cardiovasculares y para algunos cánceres

así como para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) [1, 4]. La DMT2 es una enfermedad metabólica caracterizada por presentar resistencia a insulina (RI), que afecta a más de 300 millones de personas alrededor del mundo. El aumento de prevalencia de la DMT2 se atribuye fundamentalmente al envejecimiento de la población así como al aumento de la prevalencia de obesidad [5]. Se ha demostrado que por cada kilogramo de peso corporal ganado existe un incremento en el riesgo de padecer DMT2 [6]. Debido al alto grado de correlación que existe entre estas dos enfermedades, investigadores alrededor del mundo se han centrado en determinar los mecanismos moleculares que subyacen en tal interrelación los cuales abordaremos a continuación.

1.2. Papel de la insulina en el desarrollo de Diabetes tipo 2

La insulina es una hormona polipeptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas en respuesta a elevados niveles de glucosa sanguínea. La insulina regula el metabolismo de la glucosa mediante su acción en diversos tejidos incluyendo el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo, así como en cerebro. La integración funcional de estos órganos coordina el consumo de glucosa periférica, la síntesis de lípidos y la inhibición de la gluconeogénesis en hígado [7, 8].

A nivel molecular, la insulina cumple su acción principalmente a través de la vía de señalización de la PI3K. Para activar esta vía de señalización la insulina se une a receptores localizados en la superficie de las células, produciendo su autofosforilación y la fosforilación, corriente abajo, de las proteínas IRS 1 y 2 (Sustrato del receptor de insulina), favoreciendo la activación de la quinasa PI3K (fosfatidilinosítido 3-quinasa). La PI3K promueve la fosforilación y activación de las quinasas fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP_2), la cual genera un segundo mensajero la fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) y la quinasa PDK1 que conllevan a la fosforilación y por lo tanto a la activación de proteína serina/treonina quinasa AKT/PKB (la fosforilación se lleva a cabo en los residuos de serina473 y treonina308) [9]. La quinasa AKT activa y fosforila a diversas proteínas diana, incluyendo reguladores directos de la supervivencia celular y factores de transcripción, cuyos eventos de señalización posteriores conllevan finalmente al aumento de la captación intracelular de la glucosa y por lo tanto a su disminución en sangre [7, 8, 10] (Figura 2).

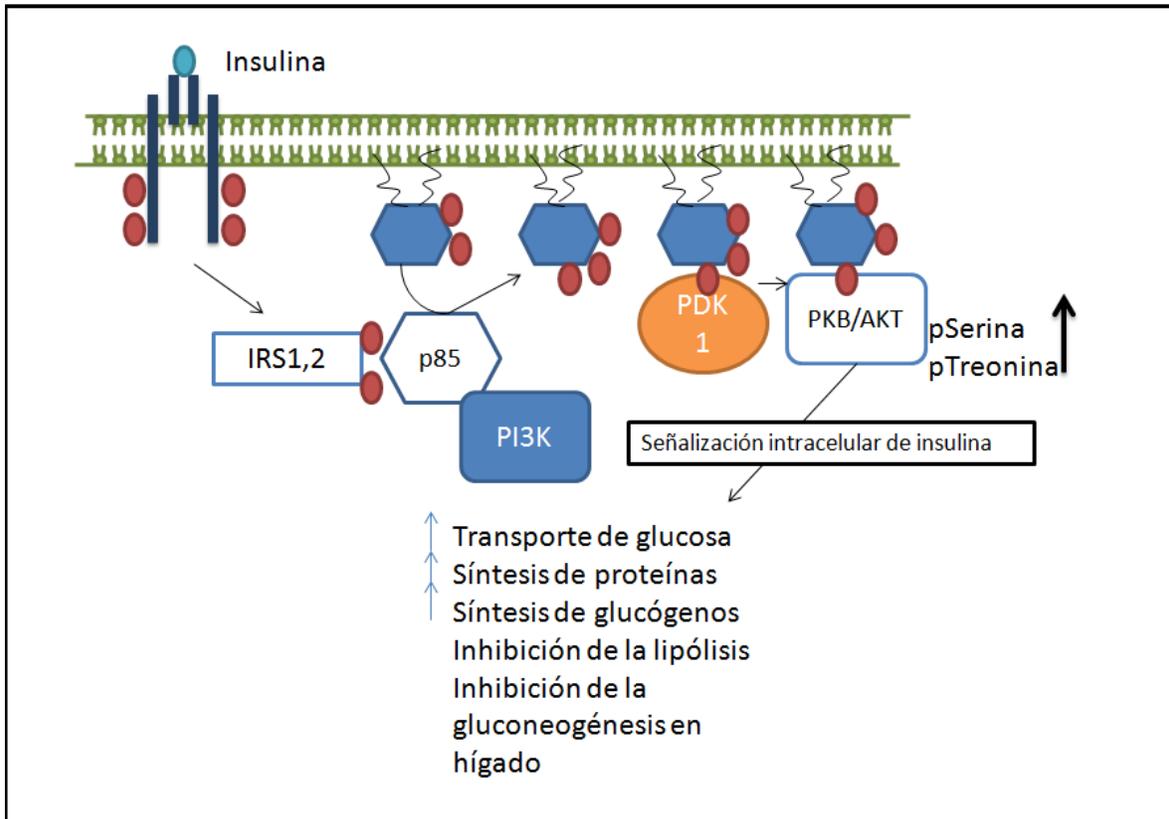


Figura 2. Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina en la etapa postprandial. Diversas quinasas son activadas por la acción de la enzima de PI3K que conlleva a la fosforilación en residuos de serina y treonina de la proteína AKT teniendo como respuesta principal aumento en la entrada de glucosa a la célula.

En un contexto de obesidad, el incremento en los niveles de lípidos circulantes favorece la generación de RI promoviendo DMT2. Se sabe que el incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos está asociado con RI periférica tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos [11, 12]. De la misma manera, la obesidad inducida por la ingesta de dieta alta en grasa en ratones decrece la sensibilidad a la insulina [13]. A nivel molecular se conoce que existen diversos mecanismos involucrados en el fenómeno de RI incluyendo la inhibición en la activación de las proteínas IRS lo que conlleva a la disminución en la fosforilación en serina o treonina de la proteína AKT y al decremento en la captación de la glucosa en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo [4] (Figura 3). Uno de los mecanismos descritos que produce este efecto, es el incremento en la actividad de la proteína cinasa c-jun N terminal (JNK) que media la fosforilación en residuos de serina (serina307) de las proteínas IRS y por lo tanto su inhibición [8]. Este padecimiento es característico en personas con problemas de obesidad y DMT2. Lo

anterior propone que el incremento en la concentración de lípidos en el contexto de obesidad promueve efectos tóxicos para la célula, un fenómeno conocido como lipotoxicidad [4, 14, 15].

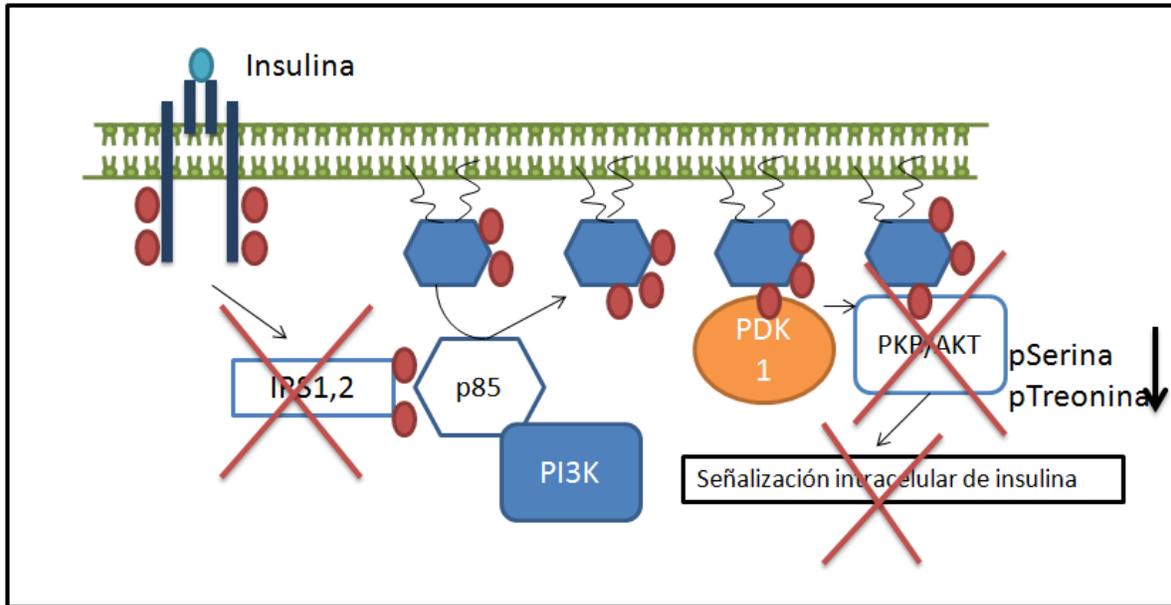


Figura 3. Mecanismos moleculares que promueven RI. La fosforilación en serina y treonina se reducen inhibiendo la acción de la proteína AKT y por lo tanto la señalización de insulina.

1.3. Resistencia a la insulina en el hipotálamo

Originalmente se pensaba que la insulina no tenía ningún papel fisiológico en la coordinación de los niveles de glucosa en el plasma a nivel del sistema nervioso central (SNC). En los últimos años se ha evidenciado que la insulina se transporta a través de la barrera hematoencefálica alcanzando diversas regiones del sistema nervioso central en donde existe una amplia expresión de receptores de insulina [16-18]. En particular se conoce que la región del hipotálamo presenta un alto contenido de receptores de insulina y su delección produce obesidad [19]. El hipotálamo es una región cerebral localizada debajo del tálamo. Está integrada por diferentes núcleos hipotálamicos en donde funcionalmente se coordinan procesos metabólicos tales como la liberación de hormonas de la hipófisis, mantenimiento de la temperatura corporal, la alimentación, ingesta de líquidos, apareamiento y agresión. Estos núcleos se dividen en 4 zonas: 1) Núcleos anteriores-mediales, en donde destaca el núcleo paraventricular que entre otras funciones participa en la regulación de la ingesta alimentaria, 2) Núcleos postero-laterales, 3)

Núcleos laterales y 4) Núcleos postero-mediales , donde destacan el núcleo ventromedial, que participa en la regulación de la homeostasis de energía, así como el núcleo arcuato y dorsomedial, que participan en funciones reguladoras de la saciedad [20-22].

En particular, el núcleo arcuato está integrado por dos distintos grupos de neuronas: las neuronas anorexígenas productoras de proopiomelanocortina (POMC) y las orexigénicas (AgRP y NPY). En el estado postprandial, la proteína precursora POMC se somete a modificaciones postraduccionales que produce la hormona α -MSH (Hormona estimulante de melanocitos alfa), la cual es liberada de las terminales sinápticas de las neuronas POMC hacia el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN), dorsomedial (DMH) y el área hipotalámica lateral (LHA), donde residen los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3/4R). Posterior a la activación de dichos receptores se incrementa el gasto energético, y se promueve la regulación del metabolismo de la glucosa. De manera inversa, las neuronas AgRP/NPY son activadas bajo condiciones de ayuno que estimulan el apetito e inhiben el gasto energético [8, 23-26].

Dado que el núcleo arcuato contiene expresión abundante de receptores de insulina, se ha propuesto que la insulina regula la homeostasis de energía, de manera que la administración directa de esta hormona en el cerebro disminuye la ingesta de alimento y reduce el peso corporal. Por lo contrario, estos efectos son revertidos al inhibir la señalización de insulina [23]. Por lo tanto, mientras que los efectos de la insulina en la periferia son disminuir los niveles de glucosa en sangre a través de su almacenamiento y conversión en productos intermediarios de energía en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético, a nivel del SNC, la insulina participa en la regulación de la homeostasis de glucosa y energía, además de participar en la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal, todo esto a través de la activación neuronal del sistema de melanocortinas formado básicamente por neuronas del núcleo arcuato en hipotálamo [8, 23].

Por lo anterior, es de esperarse que alteraciones en la sensibilidad a la insulina en el hipotálamo conlleva a una alimentación descontrolada y como consecuencia a un incremento en el peso y la adiposidad [25]. Tanto la diabetes como la obesidad son desordenes con una importante patología neuroendocrina en la cual las vías del SNC, que acoplan las necesidades del organismo con la ingesta de alimento y la producción de nutrientes endógenos, son propensas a fallar [25]. Se ha visto que el consumo de dietas altas en grasa por períodos de tiempo de 72 h son suficientes para reducir la sensibilidad de insulina en el hipotálamo, lo cual es independiente de cambios en el peso corporal y

grasa en roedores [23]. Lo anterior sugiere que el hipotálamo puede ser un blanco temprano en la toxicidad de los lípidos en el contexto de obesidad.

1.4. Efecto de los lípidos saturados sobre la resistencia a la insulina

En el contexto de obesidad, se conoce que el tipo de lípidos difieren en el grado de toxicidad, proponiendo que ciertas especies como las ceramidas y diacilgliceroles promueven efectos más tóxicos que los triacilglicéridos [27, 28]. Existe evidencia experimental en humanos y modelos animales, de que la lipotoxicidad durante la obesidad, puede causar alteraciones en la función de las células beta pancreáticas del músculo esquelético y cardíaco e inclusive puede inducir esteatosis hepática, contribuyendo así a la generación de la RI y la DMT2 [29-33].

En este sentido, está bien fundamentado que la ingesta o incremento de lípidos saturados, particularmente el ácido palmítico, promueve desregulación de la ingesta de alimentos e incremento en el peso corporal promoviendo obesidad, y de hecho, se ha demostrado que la activación de diversas rutas de señalización intracelulares puede ser la causa de este desperfecto [34, 35]. De esta manera, se ha publicado que la inducción de obesidad en ratones por ingesta de dieta alta en ácido palmítico activa a la proteína cinasa C (PKC- θ), quien regula negativamente la capacidad de la proteína IRS-1 o 2 para activar la vía PI3K-AKT, promoviendo RI en el hipotálamo [14, 36]. Otras hipótesis planteadas sobre mecanismos de lipotoxicidad son: la inflamación, el estrés oxidativo, la hiperinsulinemia y la activación del estrés de retículo endoplásmico [37].

1.5. Daños subcelulares por acumulación de lípidos saturados asociados a resistencia insulina

1.5.1. Estrés del retículo endoplásmico y resistencia a la insulina

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo importante en procesos tales como la homeostasis de calcio, secreción y plegamiento de proteínas y biosíntesis de lípidos. En particular las proteínas se translocan a través de la membrana del retículo endoplásmico como de cadenas polipeptídicas donde son plegadas en su conformación tridimensional mediante la asistencia de chaperonas moleculares tales como la chaperona BIP (GRP78), proceso al que se le conoce como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés). En condiciones basales, BIP se encuentra unido a moléculas de señalamiento en la membrana del RE incluyendo IRE1 α (*Inositol-requiring enzyme 1*),

PERK (*Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) y ATF6 (*Activating transcription factor 6*). Sin embargo, si se acumula un exceso de proteínas sin plegar o mal plegadas, BIP se une a ellas, quien a su vez se libera de su unión con IRE1 α , PERK y ATF6. La activación de PERK fosforila y por lo tanto inhibe a eIF2 α (factor de iniciación de la traducción de proteínas), esto como señal de supervivencia de la célula para reducir la carga del RE. El estrés del RE es entonces restaurado por la UPR, mediado por la transcripción de XBP1, pero con el paso del tiempo, este proceso podría tornarse menos efectivo, en cuyo caso el estrés de RE conlleva a la muerte celular, mediada por la IRE1 α . De la misma manera, la UPR activa a ATF6 que induce la expresión de genes asociados tanto a la restauración de la homeostasis del RE (que incluye BIP) como la autofagia (Figura 4). La UPR puede activar también otras rutas de señalamiento y producir estrés celular incluyendo a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's), JNK entre otras. En su conjunto se produce la inhibición general de la síntesis proteica, un incremento de la expresión de chaperonas, que incluye a BIP, un aumento de la degradación de ARNm que codifican proteínas de la vía secretora y el incremento en la actividad del proteosoma para degradar las proteínas mal plegadas [10, 38]. Las proteínas correctamente plegadas son liberadas de BIP y se encuentran listas para su transporte al aparato de Golgi. Sin embargo, las proteínas plegadas incorrectamente son dianas de degradación. Un desequilibrio entre la demanda celular de síntesis proteica y la capacidad del retículo endoplásmico para promover su maduración y secreción puede conllevar a una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, condición conocida como **estrés del retículo endoplásmico**. Procesos patológicos tales como agotamiento del calcio en el RE, alteración en la glicosilación de proteínas, privación de nutrientes, estrés oxidativo, fluctuaciones en la homeostasis de energía o daño al ADN, puede afectar el plegamiento de proteínas, favoreciendo la generación de estrés de RE.

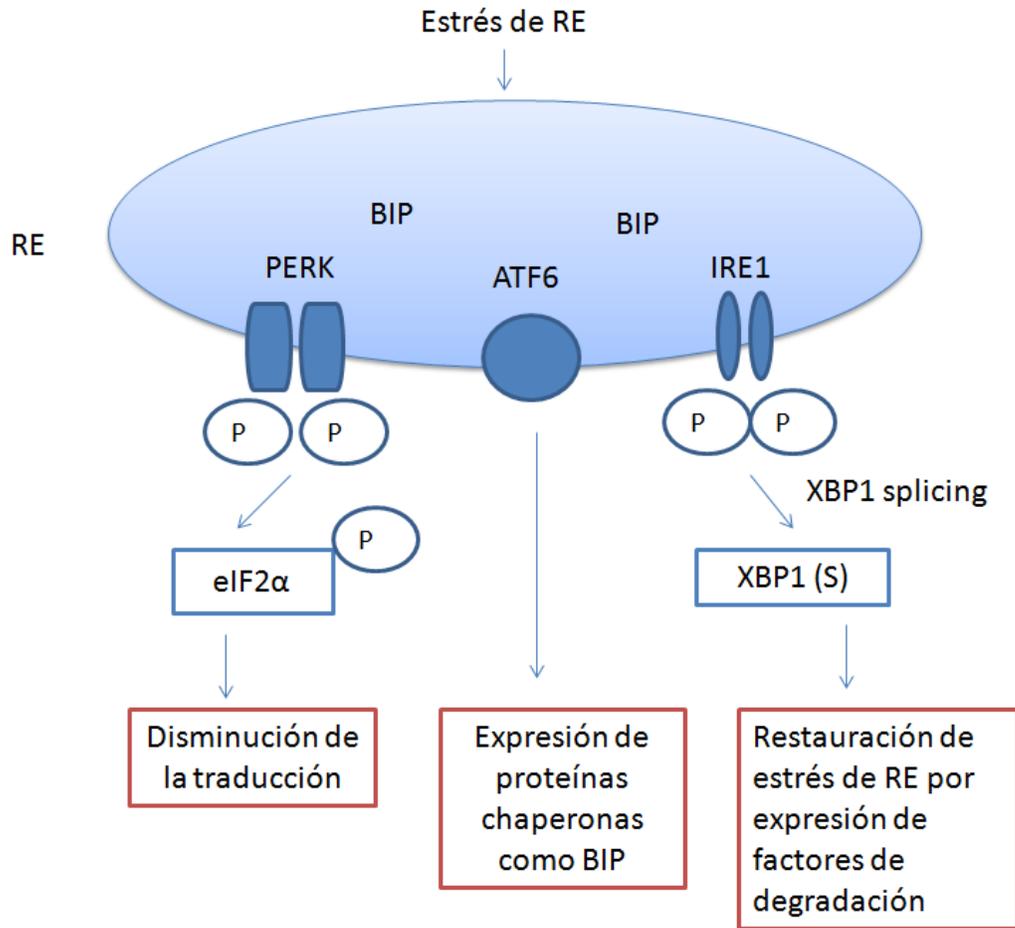


Figura 4. La activación de UPR promueve la restauración del estrés de RE a través de la activación de PERK, ATF6 e IRE1, lo que conlleva a disminución en la traducción, expresión de chaperonas como BIP así como expresión de factores de degradación.

En la última década se ha destacado la contribución del estrés del retículo endoplásmico en el desarrollo de alteraciones metabólicas que incluyen a la obesidad y DMT2 [39]. Se ha confirmado el incremento en algunos marcadores del estrés del retículo endoplásmico en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes [40, 41]. Asimismo en modelos *in vitro* también se demostró la activación del estrés de RE durante la exposición a niveles elevados de ácidos grasos saturados (ácido palmítico) en cardiomiocitos, células β pancreáticas, células hepáticas así como células musculares [41-46]. De la misma manera estudios *in vitro* en una línea celular de neuronas indican que la exposición a ácido palmítico produce activación de marcadores de estrés de RE (peIF2 α y splicing de XBP1 (*Xbox binding protein 1*)), así como RI [15].

Por su parte en modelos *in vivo*, se demostró que alteraciones en la composición de lípidos y ácidos grasos en hígado promueve alteraciones en la homeostasis de calcio mediante la inhibición de la bomba de calcio ATPasa del RE (SERCA) generando como consecuencia activación del estrés de RE [47]. En este contexto se ha demostrado que el efecto tóxico de los lípidos durante la obesidad no solo tiene lugar en los órganos periféricos sino también a nivel del sistema nervioso. Así la ingesta de dieta alta en grasa activa el estrés del RE en el hipotálamo, promoviendo RI central y periférica, y el desarrollo de DMT2 [8]. Se conoce que uno de los mecanismos por los cuales la incubación con lípidos promueve estrés del RE es mediante la activación de la JNK, la cual como se mencionó anteriormente media la inhibición de las proteínas IRS por fosforilación en residuos de serina (serina307) [8].

Se conoce que la ingesta por 7 días de dieta grasa en roedores promueve la activación de la glía, la cual se propone como una respuesta asociada al daño cerebral en la región del hipotálamo [48]. Aunque no se sabe si la activación de estos mecanismos favorece la activación de estrés de RE, parece ser que en el contexto de obesidad, el hipotálamo es un órgano altamente susceptible a presentar daño tóxico por lípidos en etapas tempranas comparado con los órganos periféricos.

1.5.2. Disfunción mitocondrial y resistencia a la insulina

Las mitocondrias representan el segundo organelo que se afecta por la acción tóxica de los lípidos en el contexto de obesidad. La función de las mitocondrias es crucial para la generación de energía metabólica en las células eucariotas. Son responsables de la producción de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que se convierte a ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana. La membrana interna forma numerosos pliegues (crestas), que se extienden hacia el interior (o matriz) del orgánulo [10].

La mitocondria es altamente eficiente en la utilización del oxígeno y de los sustratos metabólicos, para producir energía celular en forma de ATP. La cadena respiratoria mitocondrial está localizada en la membrana interna donde se lleva a cabo la producción de ATP que requiere 2 importantes pasos: 1) oxidación de NADH o FADH₂ (provenientes de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico, además de la β oxidación de los ácidos grasos)

y 2) fosforilación de ADP para formar ATP. De esta manera, los electrones provenientes de los sustratos oxidados son transferidos al oxígeno, por una serie de reacciones de oxidación-reducción para generar agua. En este proceso, los protones son bombeados desde la matriz mitocondrial para cruzar la membrana mitocondrial interna por medio de los complejos respiratorios (I, III y IV) que componen la cadena de fosforilación oxidativa [10, 49]. (Figura 2)

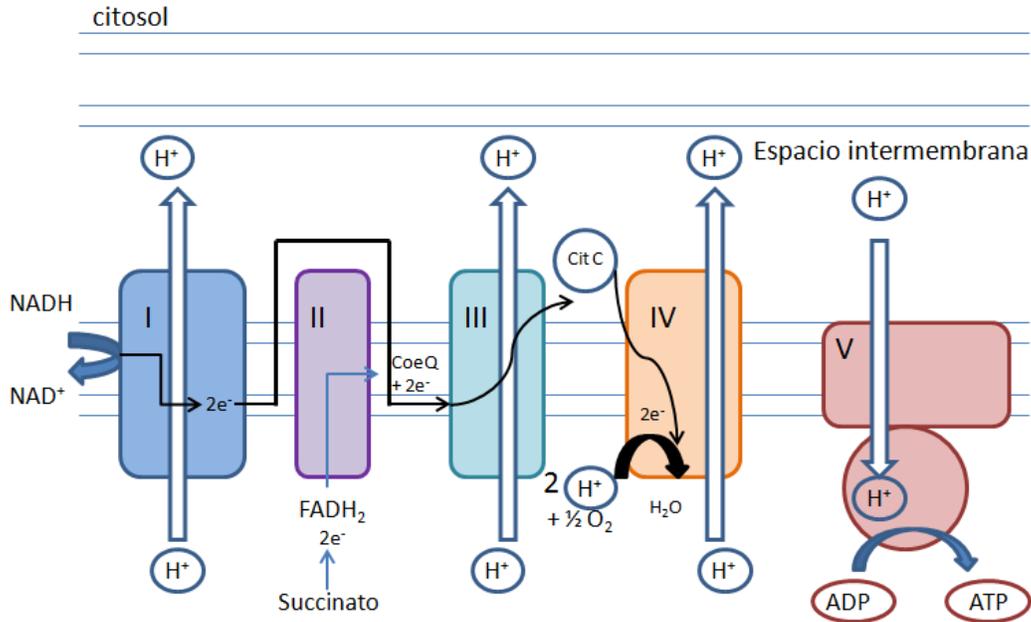


Figura 5. Cadena respiratoria mitocondrial y metabolismo de nutrientes. Se lleva a cabo en dos pasos: oxidación de NADH o FADH $_2$ que son generados por la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico del metabolismo de la glucosa o por la β -oxidación de los ácidos grasos y fosforilación de ADP para formar ATP.

La mitocondria realiza procesos de fusión y fisión como parte de su dinámica mitocondrial. En la fusión mitocondrial participan proteínas llamadas mitofusinas (Mfn1 y Mfn2), las cuales son GTPasas localizadas en la membrana mitocondrial externa que, junto con la proteína OPA1 localizada en el espacio intermembrana y asociada a la membrana mitocondrial interna, coordinan la fusión de la membrana mitocondrial externa e interna respectivamente de mitocondrias opuestas. La Mfn2 también se ha visto que participa en la interacción entre RE y mitocondria. Además, la mitocondria secuestra calcio citoplasmático y regula las implicaciones de este catión en el funcionamiento celular, de manera que mantiene la homeostasis de calcio [50, 51].

Estudios recientes han demostrado que la unión entre el RE y la mitocondria juega un papel crucial en la regulación de la muerte celular o apoptosis, teniendo como un

importante factor de señalización la liberación de altas concentraciones de calcio por parte del RE [50, 51]. (Ver secciones siguientes).

Amplia evidencia científica demuestra que la disfunción mitocondrial se asocia a la generación de RI, obesidad y diabetes [52-56]. En particular se conoce que los ácidos grasos pueden inducir cambios en la actividad mitocondrial, lo cual puede producir disfunción mitocondrial. Por ejemplo ratones expuestos a dietas altas en grasa por 5 días reducen la síntesis de ATP así como la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa y biogénesis mitocondrial [57-60]. En este contexto la exposición a ácidos grasos produce acumulación de diacilglicerol y ceramidas que conlleva a reducción en la señalización de PI3K y la generación de RI [58, 61]. De la misma manera, el aumento en la β -oxidación mitocondrial y aumento en el peróxido de hidrógeno afecta el balance redox en la célula y produce resistencia a la insulina [62].

Sin embargo, de igual forma la RI en humanos se asocia a una reducción en la expresión genética mitocondrial, así como al decremento en la expresión de proteínas de las subunidades de la cadena respiratoria, del DNA mitocondrial, de la actividad enzimática oxidativa y de la densidad y tamaño mitocondrial [58, 60, 63]. Además en pacientes diabéticos se ha visto que presentan daño en la respiración mitocondrial [58]. Por lo anterior, no está del todo claro si la disfunción de la mitocondria es causa o consecuencia de las alteraciones metabólicas durante la obesidad que dan lugar a la generación de la resistencia a la insulina y la DMT2 o es parte de un círculo de toxicidad con causas aún desconocidas.

1.5.3. Contactos Retículo endoplásmico – Mitocondria: MAMs

Se conoce que el retículo endoplásmico y la mitocondria se encuentran estrechamente asociados, pero no fue sino hasta los años 90's que se demostró que ambos organelos interactúan espacial y metabólicamente a través de una región conocida como Membranas asociadas a la mitocondria (MAMs) [50].

Las MAMs son un dominio celular formado por las membranas del retículo endoplásmico y de la mitocondria separadas por una distancia de 10-25 nm, permitiendo el contacto directo entre ambos organelos [50, 64]. Estudios de proteómica en la región de las MAMs han identificado diversas proteínas (355 enzimas entre las cuales hay, 164 transportadores, 81 cinasas, 34 canales iónicos y 31 fosfatasas). Este conjunto de

proteínas facilitan procesos bioquímicos entre ambos, destacando la función mitocondrial, fosforilación oxidativa, la síntesis de lípidos, el transporte calcio y la regulación del metabolismo energético [64-70].

En particular se conoce que el intercambio de calcio entre retículo endoplásmico y mitocondria se favorece a través del complejo formado por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1) en la mitocondria y las proteínas dependientes de calcio: (Grp75)/inositol y el receptor 1,4,5 trifosfato (IP3R)-1 en el retículo, siendo en este último organelo en donde la proteína chaperona BIP, se une con IP3R para regular el transporte de calcio [65]. El RE tiene una alta concentración de calcio (100-500 μ M) comparada con la encontrada en el citosol o en la mitocondria (10-100nM). El flujo de calcio va del RE a través de las MAMs hacia la mitocondria donde facilita la producción de ATP a través de la activación de deshidrogenasas mitocondriales [50, 65].

1.6. La Mitofusina 2 y su importancia en la célula

De interés para nuestro trabajo, en la región de las MAMs se localiza la Mitofusina 2 (Mfn2). La Mfn2 es una proteína constituida por un dominio N-terminal y un dominio C-terminal corto expuesto al citosol, que pesa 86 KDa y está presente tanto en la membrana externa de la mitocondria como en la membrana del RE [71]. Otras proteínas que participan en esta asociación son el complejo Mmm1/Mdm10,12,34 [50]. La Mfn2 regula la proliferación celular, metabolismo oxidativo, homeostasis de calcio, respiración celular, y el potencial de membrana mitocondrial por lo que juega un papel importante en la actividad metabólica mitocondrial así como en el balance energético [72]. La proteína Mfn2 es necesaria para que las vías de reparación y muerte celular actúen eficazmente, además, junto con la Mfn1, es requerida también para la estabilidad del DNA mitocondrial [73]. La importancia del dominio de las MAMs está muy bien ilustrada con un estudio reciente en donde se propone a la Mfn2 como coordinadora de la UPR a través de su interacción con PERK, por lo que la carencia de Mfn2 en células sujetas a activación de estrés de RE se protegen en contra de la apoptosis y la autofagia [74].

1.7. Papel de la Mitofusina 2 en la generación de diabetes durante la obesidad

Se ha reportado que los niveles de la Mfn2 se ven reducidos en músculo esquelético de pacientes obesos y con diabetes tipo 2 [75].

Asimismo, recientemente se demostró que empleando cultivo de hepatocitos, la integridad de las MAMs es importante para la señalización de la insulina y que tal inducción se ve afectada por alteraciones inducidas por el ácido palmítico [64]. Por su parte, empleando cultivo de neuronas se ha evidenciado que la acumulación de lípidos como GM1-gangliosido en fracciones de las MAMs recluta al receptor IP3 favoreciendo la apertura del canal de calcio e incrementando el flujo de calcio a la mitocondria y la generación de muerte neuronal [76].

Lo anterior tiene sentido dado que la Mfn2 es una proteína clave en la regulación de los flujos de calcio y la homeostasis metabólica. Estudios *in vivo*, han demostrado que en ratones carentes de Mfn2 en músculo esquelético o en hígado se modifica la morfología de la mitocondria, se altera la función mitocondrial y se incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno, estos eventos correlacionan con la activación de la proteína JNK generando RI [77]. De la misma manera, la ausencia de la Mfn2 promueve estrés de RE y la activación de la proteína JNK, favoreciendo el fenómeno de RI [77].

La ingesta de dieta grasa en roedores disminuye la expresión genética de Mfn2 y de su proteína en músculo esquelético favoreciendo la generación de RI [78]. Lo anterior fue corroborado *in vitro* proponiendo que la estimulación de células musculares con el lípido saturado ácido palmítico, disminuye los niveles de la Mfn2, lo cual correlaciona con el decremento en la expresión de enzimas antioxidantes, activación de estrés oxidativo y la activación de la proteína JNK y NF- κ B, dos marcadores de la resistencia a la insulina [79].

Finalmente, se ha demostrado que la delección de la Mfn2 en las neuronas anorexígenas POMC del núcleo arcuato promueven pérdida en los contactos RE-mitocondria, activación del estrés del RE y resistencia a la leptina [80]. Por su parte la ingesta de dieta alta en grasa en ratones promueve alteraciones metabólicas a través de la disminución en los contactos estrés del RE y mitocondria [80]. Estos cambios son específicos del tipo de célula, ya que en estudios de las neuronas orexigénicas AgRP, la deficiencia de Mfn1 o 2 no causa estas alteraciones [81].

En su conjunto, la Mfn2 es una proteína clave en el mantenimiento de los contactos RE-mitocondria tanto en tejidos como hígado y músculo esquelético así como en cerebro, en cuya ausencia promueve alteraciones metabólicas que producen RI y la generación de DMT2.

En particular, se propone que los lípidos saturados (ácido palmítico) a nivel de neuronas de hipotálamo de ratón promoverán el decremento en la expresión de Mitofusina 2, generando incremento en el estrés del RE y disfunción mitocondrial favoreciendo la resistencia a la insulina. (Figura 6).

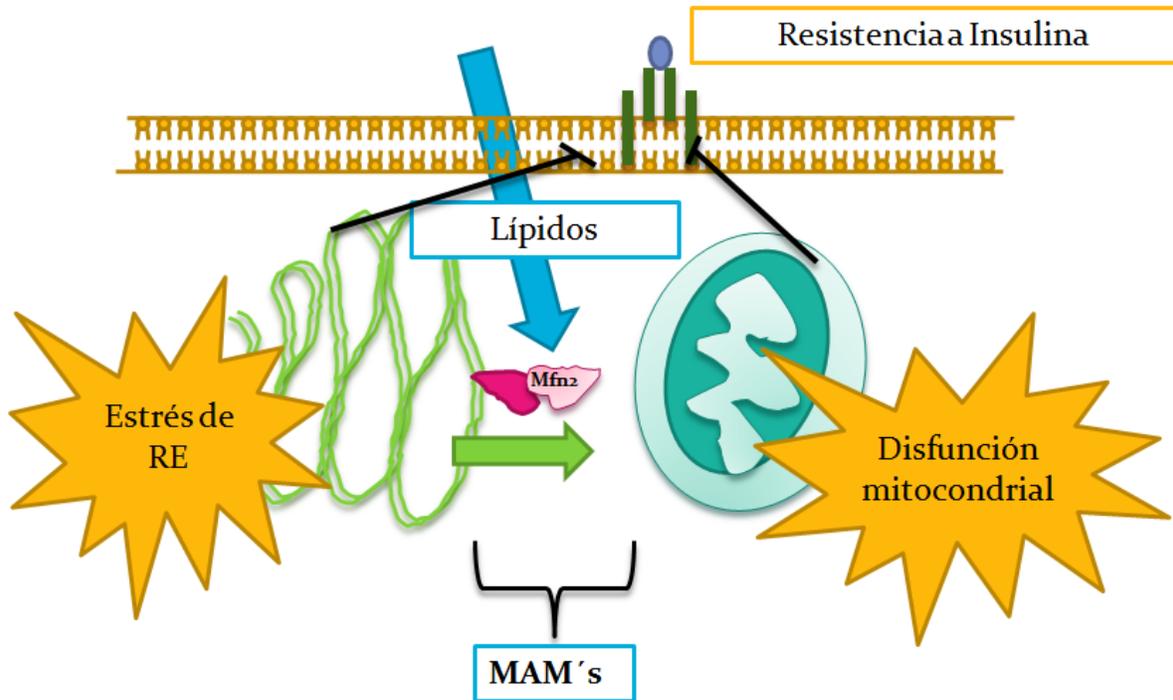


Figura 6. Propuesta de proyecto. Los lípidos saturados reducen los niveles de la Mfn2 produciendo estrés del RE lo y disfunción mitocondrial favoreciendo la generación de RI en el hipotálamo de ratón.

2. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de la obesidad y la epidemia de la diabetes han conllevado a una exhaustiva investigación sobre el papel del sistema nervioso central (SNC) en la regulación de la ingesta de alimentos, ganancia de peso corporal y homeostasis de glucosa.

Por lo tanto, es de vital importancia, indagar en los mecanismos de señalización hormonal en SNC, incluyendo la insulina, así como identificar qué tipo de especies de lípidos promueven efectos deletéreos sobre la señalización de insulina en el cerebro. Proponemos que los lípidos saturados podrían alterar regiones subcelulares propensas a sufrir cambios asociados a daños en la sensibilidad a la insulina que comprometan la estabilidad celular y conlleve a complicaciones metabólicas.

El desarrollo de esta tesis contribuirá a base de conocimiento en ciencia básica, en la identificación de blancos terapéuticos que restablezcan la regulación en la ingesta de alimentos y la homeostasis de glucosa.

3. HIPÓTESIS

El incremento y la acumulación de lípidos en el hipotálamo durante la obesidad, decrece los niveles de la Mfn2 y promueve la generación de estrés de RE favoreciendo la RI.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Proponer un mecanismo a partir del cual los lípidos afectan la región de las membranas asociadas a la mitocondria y determinar su efecto en la sensibilidad a la insulina en el hipotálamo.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar en un modelo *in vitro* el efecto del lípido saturado ácido palmítico para promover cambios en la expresión de la Mfn2 y la activación del estrés del RE, y correlacionarlo con la sensibilidad a la insulina.
2. Evidenciar la RI corporal en ratones empleando un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa.
3. Caracterizar los niveles de la Mfn2 en el núcleo arcuato y dorsomedial del hipotálamo de ratones obesos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material

SIGMA

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose DMEM, No. Cat D5648-1L
- Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido) 99.5%, No. Cat D5879-100L
- Sodium dodecyl sulfate, SDS (Dodecil sulfato de Sodio) No. Cat L3771-100G
- Trizma base, No. Cat T1503-1KG
- Glycine (Glicina), No. Cat G8898-1KG
- Sodium Chloride (Cloruro de Sodio), No. Cat S-9888
- Methanol (Metanol), No. Cat 322415-2L
- Glycerol (Glicerol), No. Cat G5516-500ML
- 0.25% Trypsina-EDTA (Tripsina-EDTA) No. Cat T4049-500ML
- Trypan Blue (Azul Tripano) No. Cat T-6146
- Palmitic acid 99% (Ácido Palmítico), No. Cat 258725-25G
- Palmitoleic acid ≥98.5% (GC) (Ácido palmitoleico) No. Cat P9417
- Tritón™ X-100 No. Cat T9284-100ML
- Potassium Chloride (Cloruro de Potasio) No. Cat P-4504
- Azul de Bromofenol No. Cat 114405-5G
- Anticuerpo primario anti- Actina

BIO-RAD

- Ammonium persulfate APS, (Persulfato de Amonio), No. Cat 161-0700
- 2-Mercaptoethanol, No. Cat 161-0710
- N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine, (TEMED), No. Cat 161-0801
- Clarity™ Western ECL Substrate (Luminol y Peróxido), No. Cat 1705061
- Quick Start™ Bradford 1x dye reagent (Reactivo de Bradford) No. Cat 5000205
- 30 % Acrylamida/Bis (Acrilamida) No. Cat 161-0158-500ML
- Quick Start™ BSA Standard set (Estándares de la proteína Albúmina bovina sérica) No. Cat 500-0207

CTR SCIENTIFIC

- Alcohol Etílico, No. Cat CTR 01160

ABCAM

- Anticuerpos primarios: anti-GRP78/BIP(ab108613), anti-Mitofusin 2 (Mitofusina 2) (ab56889), anti-panAKT (AKT total) (ab8805)

CELL SIGNALING

- Anticuerpo primario anti-pAKT S473 (4051S)
- Anticuerpo secundario HRP-Mouse IgG No. Cat 7076S

SAKURA

- Tissue Tek® O.C.T.™ Compound, No. Cat 4583

PROMEGA

- Cell Titer-Glo® Reagent para ensayo de ATP, No. Cat ADG7572

ROCHE DIAGNOSTICS

- Cell proliferation kit para ensayo de MTT, No. Cat 11465007001

THERMO SCIENTIFIC

- Spectra™ Multicolor Broad Range protein Ladder (Marcador de peso molecular), No. Cat 26634

BIOWEST

- Bovine Serum Fetal (Suero Fetal Bovino, SFB), No. Cat US1520

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC

- Bovine Serum Albumin (BSA) (Albúmina bovina sérica) No. Cat SC-2323
- Anticuerpo secundario HRP Rabbit No. Cat SC-2370

EQUITECH-BIO INC

- Bovine Serum Albumin Free Fatty Acid (BSA FFA) (Albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos) No. Cat BA116

HUMALOG

- Insulina (100 UI/mL) No. Cat VL7516

Soluciones

- Phosphate-Buffered Saline PBS, (Buffer de fosfatos salino) 1X (NaCl 1.4M, KCl 30mM, Na₂HPO₄ 81mM, KH₂PO₄ 15mM)
- Buffer de lisis (NaCl 150mM, TRIS HCl 25mM pH 7.4, NaF 5mM, b-glicerofosfato 10mM, Ortovanadato de Na activado 1mM, Tritón 0.4%, pastilla de inhibidor de proteasas Roche)
- Buffer TRIS para gel de resolución 1.5M pH 8.8
- Buffer TRIS para gel de apilamiento 0.5M pH 6.8
- Buffer de corrida 10X (SDS 10g, TRIS, 30.3 g, glicina 144g)
- Buffer de transferencia 10X (TRIS 30.3g , glicina 144g, Metanol 10%)
- Buffer Tris-Buffered Saline (Buffer Tris Salino) 1X (NaCl 150 mM, TRIS 50 mM pH 7.4)
- Laemmli 5X (Tris-HCl 1.5M, Glicerol, SDS, Azul de bromofenol 1%)

5.2. Modelo *in vitro*

ESTRATEGIA GENERAL

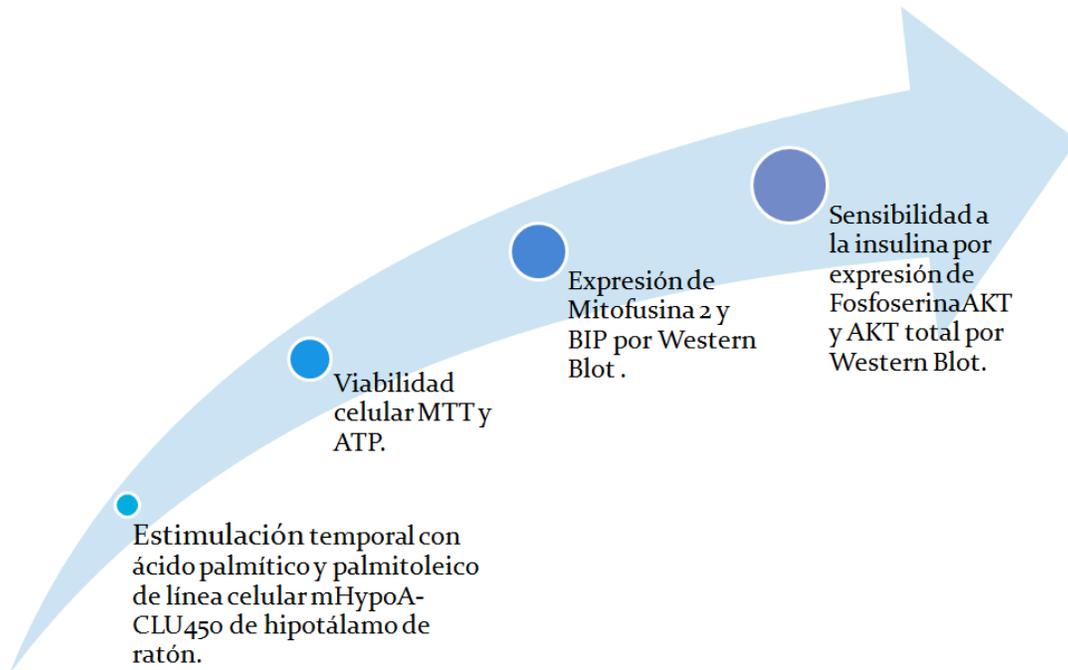


Figura 7. Estrategia general *in vitro*

5.2.1. Cultivo Celular

- Todo el trabajo de cultivo se realizó en campana de bioseguridad tipo 2 para evitar contaminación de las células.
- Se descongeló una alícuota de células (neuronas de hipotálamo de ratón de la línea mHypoA-CLU450) contenida en vial de 1 mL con DMEM (10% SFB, 25mM de glucosa y 1% penicilina/estreptomicina) y 10% DMSO.
- Las células se centrifugaron 5 min para eliminar el DMSO. Posteriormente se sembraron en frasco de 25 cm² agregando 5 mL de medio DMEM y se incubaron a 37°C y 5% CO₂.
- Al obtener confluencia de 80-90%, las células se resembraron eliminando el medio de cultivo y agregando 1.5 mL de Tripsina-EDTA 1x (2.5% tripsina, 0.04 g EDTA).
- Las células se incubaron 5 min a 37°C y 5% CO₂ para despegarlas.

- f. Se agregó medio de cultivo para inactivar la tripsina y las células se sembraron en frasco nuevo de cultivo o en cajas para experimento.

5.2.2. Preparación de las soluciones: ácido palmítico, ácido palmitoleico e insulina

- a. Se preparó el stock de ácido palmítico (PM:256.4 g/mol) a 50 mM, pesando en balanza analítica la cantidad de 0.0012 g y agregando 100 μ L de etanol para disolver.
- b. Para el ácido palmitoleico (PM: 254.4 g/mol), se preparó primeramente la solución stock a una concentración de 5 mM, se tomaron 2.84 μ L de esta solución y se agregaron a 2 mL de BSA 10%
- c. Para preparar la solución de insulina, se hizo dilución 1:10 (Insulina 100 UI/mL) para obtener una concentración de 61 μ M, tomando de la ampolleta de insulina una cantidad de 10 μ L y se llevaron a 100 μ L con agua miliQ.

5.2.3. Viabilidad celular (Ensayos de % de síntesis de ATP y reducción de MTT)

- a. A partir de frasco confluyente de células, se realizó el procedimiento antes descrito para despegar las células.
- b. Una vez centrifugadas las células, se agregó 1 mL de medio de cultivo y se contaron las células en cámara de Neubauer.
- c. Para realizar conteo, se tomó 4 μ L de células y se realizó dilución 1:5 agregando 16 μ L de azul tripano 0.2%.
- d. Se tomaron 10 μ L de la solución y se colocaron en cámara de Neubauer (por duplicado, cada uno con 4 cuadrados) y se contaron las células. Cada cuadrado de la cámara con cubre objeto representa un volumen total de 0.1 mm³ o 10⁻⁴ cm². La cuenta se determinó usando la siguiente fórmula: para obtener No. células/mL, multiplicar No. total de células por factor de dilución por 10⁴.
- e. Al obtener el número de células se calculó el volumen de medio necesario para agregar a las células y obtener 20,000 células en un volumen de 50 μ L.
- f. Se agregaron 50 μ L de células a cada pocillo de una caja de 96 hasta cubrir lo necesario para la estimulación y se dejaron las células adherir por 24 h.
- g. Se prepararon los lípidos (ácido palmítico y palmitoleico) para agregar 50 μ L a cada pocillo y obtener un volumen final 100 μ L. Para esto se realizaron los cálculos para obtener por pozo concentraciones de 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M y 500 μ M para ambos lípidos, a partir de stock de ácido palmítico de 5mM (dilución 1:10

de stock de 50 mM) y stock de 5 mM para palmitoleico, además de contar con un control sin tratamiento. Se realizó por duplicado. Se incubaron los lípidos en BSA (libre de ácidos grasos) FFA 10% durante 5 min previo a agregar en pocillo, con la cantidad necesaria para que la concentración final fuera 1%.

- h. Las células se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ durante 24 h
- i. **Para ensayo de ATP**, se agregaron a las células 100 µL de reactivo Cell Titer Glo. Se agitaron por 2 min para inducir lisis celular y se incubaron 10 min a 37 °C para estabilizar la señal luminiscente y medir luminiscencia en luminómetro.
- j. **Para ensayo de MTT**, se cambió el medio de cultivo a las células y se agregaron nuevamente 90 µL de medio. Se añadieron posteriormente 10 µL de reactivo MTT y se incubó durante 4 h a 37 °C. Se agregaron 100 µL de solución solubilizadora y se incubó toda la noche a 37 °C para leer en espectrofotómetro a longitud entre 550 y 600 nm.

5.2.4. Cultivo de células y tratamiento con lípidos

- a. A partir de un frasco confluyente de células, se realizaron los procedimientos descritos anteriormente para realizar conteo de células y calcular volumen necesario para sembrar 50,000 células en un volumen de 2.5 mL de medio por pozo, en cajas de 6 pozos.
- b. Las células se incubaron a 37 °C al 5% de CO₂ hasta obtener 85-90% de confluencia.
- c. Se prepararon por un lado diferentes concentraciones de ácido palmítico 50 µM, 100 µM y 250 µM a partir de stock de ácido palmítico de 50 mM, incubando la cantidad adecuada del lípido en 10% de BSA para una concentración final de BSA en pozo del 1%. Se incubaron las células a 37 °C al 5% CO₂ durante 12 h. Se repitió el experimento 5 veces.
- d. Por otro lado, se prepararon los lípidos (ácido palmítico y palmitoleico) para obtener una concentración final por pozo de 250 µM para cada lípido, a partir de stock de ácido palmítico (50 mM) y el stock de ácido palmitoleico (2.5 mM, diluir 1:2 el stock de 5 mM), incubando la cantidad necesaria de cada lípido en BSA FFA 10% para así obtener una concentración del 1% en un volumen final de 2.5 mL. Se estimuló una placa de células con ácido palmítico y otra placa con ácido palmitoleico. Se incubaron las células a 37°C al 5% CO₂ a tiempos de 6, 12, 24 y 48 h. Se repitió el experimento 5 veces.

- e. **Experimento de sensibilidad a la insulina**, a partir de placas de 6 pozos confluentes de células (sembradas 50,000 células en 2.5 mL de medio de cultivo NOTA. Se retiró el medio con suero y se agregó medio de cultivo sin suero) se realizó el punto anterior incubando células por un lado con ácido palmítico y por otro con ácido palmitoleico (2 placas por lípido) a 250 μM a 37°C al 5% CO_2 a tiempos de 6,12 y 24 h. Posterior al tiempo de estimulación, se incubó una placa de cada lípido con insulina (61 μM) agregando 4 μl de esta solución a cada pozo para obtener una concentración final de 100 nM por un tiempo de 15 min a 37°C al 5% CO_2 . Se repitió el experimento 5 veces
- f. Posterior al tiempo de estimulación, las células se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS 1X y se agregaron 150 μL de buffer de lisis para así almacenar las placas a -20 °C.

5.2.5. Procesamiento de muestras y análisis por *Western Blot*

- g. Se rasparon las células para despegarlas del pozo y se vertió el volumen en tubos de 1.5 mL. NOTA: las células se mantuvieron en hielo a partir de este paso para evitar degradación de proteínas.
- h. Las células se sonicaron aplicando una amplificación de 100% con un total de 6 sonicaciones y posteriormente se centrifugaron (2000 g por 10 min a 4 °C). Se recuperó el sobrenadante (proteínas en solución) y se eliminaron el resto de las células.
- i. Se cuantificó la cantidad de proteínas de cada muestra. Para esto se realizó primeramente la curva de calibración con concentraciones de estándares que van de 0.125 mg/mL a 2 mg/mL, se colocaron 2 μL de cada estándar en una placa de 96 pocillos y posteriormente se agregó la misma cantidad de cada muestra. El ensayo se realizó por triplicado. Se agregaron 200 μL de reactivo de Bradford y se leyó la placa en un espectrofotómetro a 595 nm.
- j. Se realizaron cálculos (Excel) a partir de la curva de calibración para obtener la cantidad necesaria de proteína y el volumen necesario para cargar en geles de poliacrilamida. Posterior a esto se prepararon muestras ajustando todas a un mismo volumen y se agregó a cada uno el reactivo de Laemmli 5x al 20 % 2-mercaptoetanol. Previo a cargar en geles se calentaron las muestras a 100 °C durante 5 min.

- k. Se realizó el *Western Blot*, preparando primeramente geles de poliacrilamida. Se eligió primero el grosor del gel (1 mm o 1.5 mm) dependiendo del volumen a cargar (volúmenes mayores a 40 μ L, se usó 1.5 mm). Se realizó la solución para el gel (de resolución y de apilamiento) agregando la cantidades adecuadas (dependiendo de la cantidad de geles) de agua miliQ, acrilamida (el % de esta depende del peso de la proteína requerido, en este caso se usó del 8 %), SDS 10%, Buffer Tris 1.5 M (gel de resolución) o Buffer Tris 0.5 M (gel de apilamiento) APS 10% y TEMED. Se realizaron ambas soluciones para ambos geles y se agregó la cantidad adecuada al montaje de vidrios, colocando primero el gel de resolución hasta que polimerizara y posteriormente el gel de apilamiento y colocar el peine con los carriles. Una vez polimerizado este último gel se colocaron los vidrios en los electrodos que se colocaron a su vez en cámara de corrimiento y se llenó con buffer de corrida 1X.
- l. Se cargó el volumen de muestra en cada carril colocando en el primer carril un marcador de peso molecular. Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se corrieron geles a 150 v durante 1 h o hasta que la muestra corriera al final del vidrio en sentido descendente.
- m. Una vez finalizado el corrimiento, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa previamente humedecidas en buffer de transferencia 1X. Se realizó un montaje tipo sandwich en cassette sumergido en buffer de transferencia 1X con la parte color negra hacia abajo, colocando una esponja, papel filtro, la membrana, el gel, papel filtro y esponja y se colocó el cassette en electrodos (con la parte negra del cassette hacia el lado negro del electrodo, importante para una correcta dirección en la transferencia de proteínas) para finalmente conectar los electrodos a la fuente de poder a un voltaje de 85 v durante 2 h a 4 °C, o 30 v toda la noche.
- n. Después de la transferencia se obtuvo la membrana y se colocó cuidadosamente en tubo falcon para su bloqueo, agregando BSA 5% en TBS-T y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 h.
- o. Finalizado el bloqueo, se preparó el anticuerpo primario a una dilución 1:1000 y se agregó a la membrana. Se incubó con agitación a 4 °C durante toda la noche.
- p. Se preparó el anticuerpo secundario (anti-Rabbit HRP o anti-Mouse HRP según el origen del anticuerpo primario), a una dilución 1:5000 y se agregó a la membrana haciendo 3 lavados previos a ésta por 5 min, con agitación con TBS-T 1X. Se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 h.

- q. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y 1 vez con TBS 1X (5 min cada lavado con agitación).
- r. Se reveló la membrana en aparato de quimioluminiscencia agregando a la membrana luminol y peróxido de hidrógeno en proporciones iguales.

5.3. Modelo *in vivo*

ESTRATEGIA GENERAL

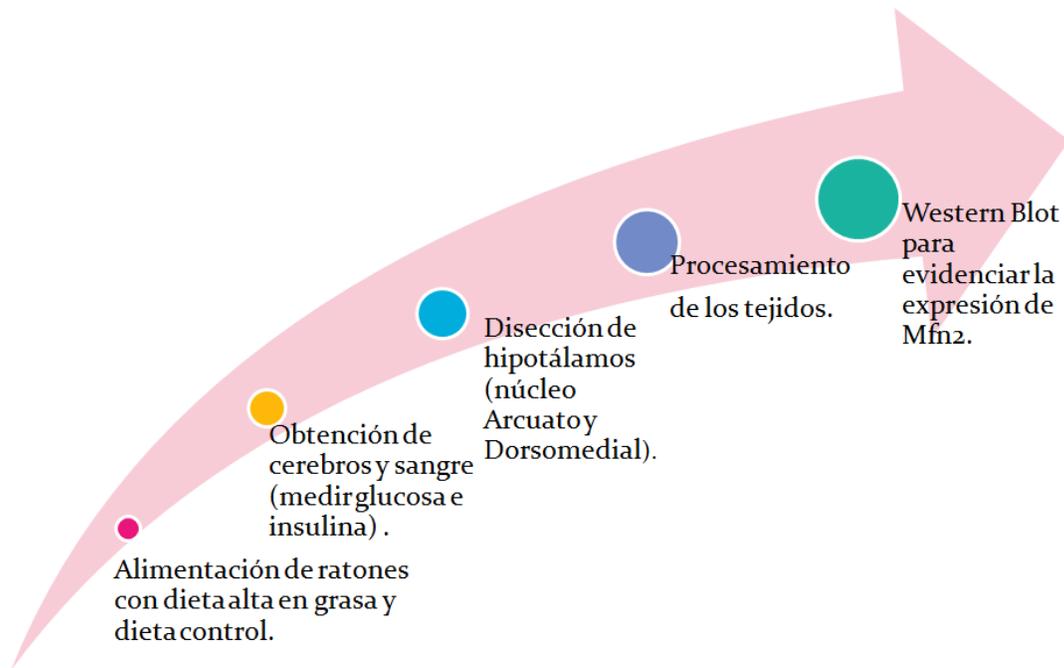


Figura 8. Estrategia general *in vivo*

- Ratones machos de 6 semanas de edad (cepa C57BL6)
- Alimentación por 1 y 3 meses con dieta control o dieta grasa (D12450B 10% grasa, D12451 45% grasa respectivamente, Research Diets). La Dieta fue amablemente proporcionada por el Dr. Armando Tovar del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán).

5.3.1. Cuidado de ratones, Dietas y Sacrificio

- a. Se agruparon los ratones machos de 6 semanas de edad con un peso aproximado de 22 g de la siguiente manera: grupos alimentados con dieta control y grupos alimentados con dieta alta en grasa (6 a 8 ratones por grupo). Ambas dietas por un tiempo de 1 mes y 3 meses. Se separaron los ratones en jaulas (3/jaula) con libre acceso a agua pura. El alimento y agua se cambiaron 2 veces por semana
- b. Se pesaron los ratones semanalmente.
- c. Una vez finalizado el tiempo de dieta para cada grupo de ratones se realizó el sacrificio de los mismos. Se colocó al ratón en cámara de CO₂ y se abrió la válvula poco a poco para lograr que el animal quedara inconsciente. Usando jeringa se obtuvo la sangre del ratón directamente del corazón (el ratón muere instantáneamente) y se colocó en tubo con anticoagulante.
- d. Se midieron los niveles de glucosa sanguínea inmediatamente. Las muestras de sangre se mantuvieron a 4 °C.
- e. Se obtuvo el cerebro del ratón, abriendo cuidadosamente el cráneo del ratón. Las muestras de cerebro se mantuvieron en hielo seco. Se realizó este mismo procedimiento para cada ratón.
- f. Se centrifugaron las muestras de sangre para obtener el plasma y almacenar a -80 °C para el posterior análisis de insulina y colesterol. NOTA: los análisis de insulina y colesterol se realizaron con la colaboración del Dr. Armando Tovar y el Dr. Iván Torre-Villalvazo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- g. Se almacenaron los cerebros a -80 °C.

5.3.2. Procesamiento de cerebros y análisis por *Western Blot*

- a. Usando un criostato a una temperatura de -15 °C, se obtuvieron las rebanadas de cerebros. Los cerebros se mantuvieron en hielo seco durante el procedimiento. El cerebro congelado se colocó en placa y se agregó Tissue-tek®. Se colocó en cámara de criostato hasta que se endureciera el Tissue-tek®. Se montó el cilindro formado de tal manera que se pudieran hacer los cortes.
- b. Se obtuvo el área donde se encuentra el hipotálamo y se colocaron las rebanadas en portaobjetos y se dejaron en hielo seco.

- c. Una vez obtenidas las rebanadas se procedió a realizar la disección de las mismas en estereoscopio para obtener la región del núcleo arcuato y dorsomedial del hipotálamo. Todo el procedimiento se realizó en hielo seco.
- d. Se colocaron los tejidos en tubos de 1.5 mL y se agregaron 150 μ L de buffer de lisis. Las muestras se almacenaron a -20 °C.
- e. Posteriormente se realizó para cada muestra el procedimiento antes descrito de procesamiento y análisis por *Western Blot*.

5.4. Análisis Estadístico

- a. Primeramente se realizó un análisis estadístico descriptivo a todos los datos para comprobar su distribución normal.
- b. Para las pruebas con diferentes grupos de tratamiento comparados contra un control sin tratamiento se aplicó una prueba de ANOVA de 2 colas con test post hoc de Dunnet considerando una p significativa menor a 0.05.
- c. En la comparación de los grupos de ratones obesos contra controles se aplicó una prueba T de student de 2 colas para muestras independientes o desapareadas considerando una p significativa menor a 0.05.
- d. Todos los datos se capturaron y analizaron en el programa estadístico NCSS y en Excel.
- e. La Densidad Óptica de las membranas de *Western Blot* fue calculada haciendo uso del programa *Image J*.

IMÁGENES DE LA METODOLOGÍA *IN VIVO*



Figura 9. Alimentación de Ratones.

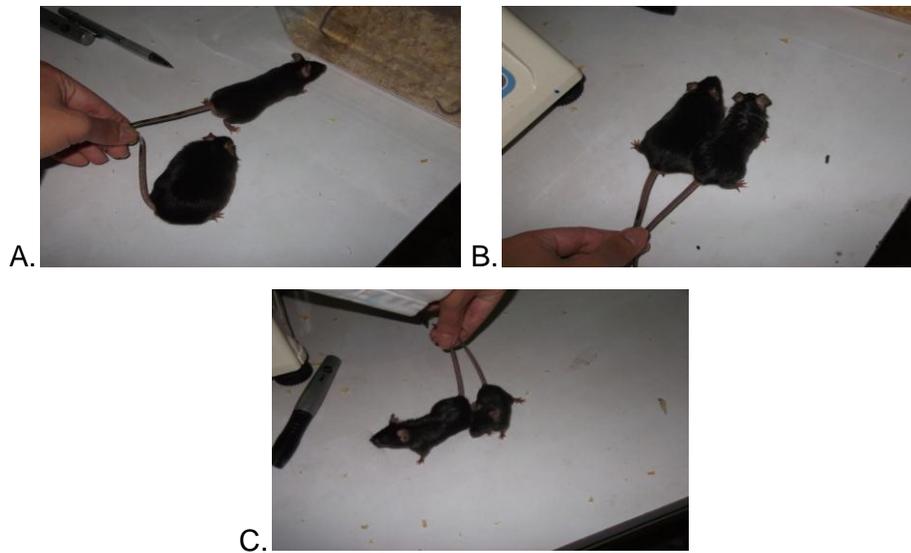
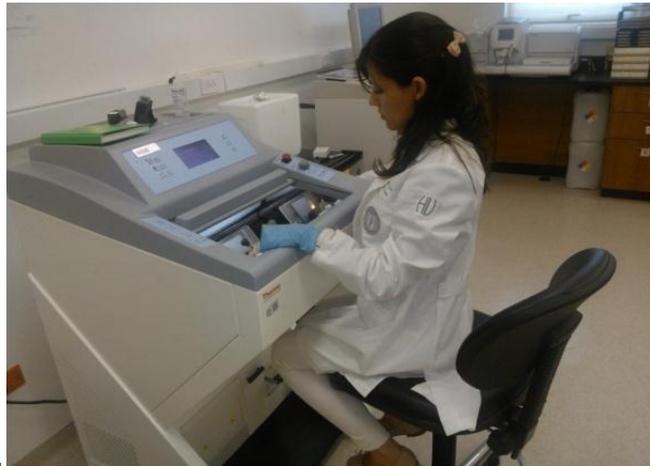


Figura 10. A. Ratón obeso de 3 meses vs Ratón control de 3 meses. B. Ratón obeso de 3 meses vs Ratón obeso 1 mes. C. Ratón obeso de 1 mes vs Ratón control 1 mes.



A.



B.

Figura 11. A. Obtención de rebanadas de cerebro en el criostato. B. Disección de cerebros para obtención de núcleos arcuato y dorsomedial

6. RESULTADOS

6.1. Modelo *in vitro*

6.1.1. Viabilidad Celular

A continuación se muestran los resultados pertinentes al ensayo de MTT, en donde el % de reducción de MTT es proporcional a la viabilidad celular (Tabla 1).

	% de Reducción de MTT			
	Ácido palmítico	SD	Acido palmitoleico	SD
control (-)	100.0	0	---	
50 μ M	89.9	0.43	94.9	8,69
100 μ M	85.4	2.84	100.1	5,12
250 μ M	70.2	6.57	90.7	6,85
500 μ M	18.4	3.06	92.3	8,21

Tabla 1. Promedio y desviación estándar (SD) del % de reducción de MTT para ambos tratamientos (ácido palmítico y ácido palmitoléico) a diferentes concentraciones.

En la Figura 12 se representan estos resultados a manera de gráfica y se puede apreciar el efecto del ácido palmítico y palmitoleico sobre la línea celular estudiada (neuronas de hipotálamo de ratón). Se observa que el ácido palmítico a una concentración de 500 μ M produce disminución significativa ($p < 0.05$) en el % de Reducción de MTT.

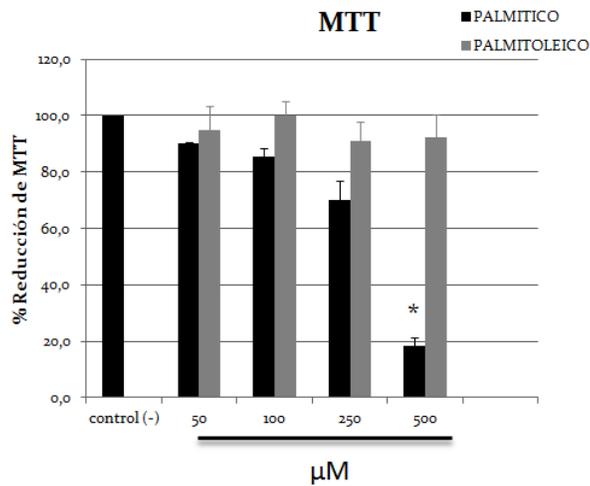


Figura 12. % de Reducción de MTT de células de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico o ácido palmitoleico a diferentes concentraciones (50, 100, 250 y 500 μ M) durante 24 h. n=5 experimentos independientes que se realizaron por duplicado. ANOVA 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p < 0.05$.

De la misma manera se realizó el análisis de la luminiscencia de nuestra línea celular siendo este resultado proporcional a la cantidad de ATP presente, lo cual nos da un claro resultado sobre la viabilidad celular. En la Tabla 2 se muestran los resultados.

	% Síntesis de ATP			
	Acido palmítico	SD	Acido palmitoleico	SD
control (-)	100.0	0	---	
50 μ M	95.3	2.34	102.4	7.75
100 μ M	94.4	2.16	100.5	3.51
250 μ M	70.1	18.96	102.4	5.89
500 μ M	3.6	3.05	113.9	3.85

Tabla 2. Promedio y SD que representa el % de síntesis de ATP, tanto del ácido palmítico como del ácido palmitoleico a las diferentes concentraciones de trabajo.

En la Figura 13 se pueden apreciar estos resultados. Se observa que al igual que el experimento anterior, el ácido palmítico a una concentración de 500 μ M reduce significativamente ($p < 0.05$) el % de síntesis de ATP, es decir disminuye la viabilidad celular. El ácido palmítico no produce cambios en la viabilidad celular en ninguno de los dos experimentos (ATP y MTT).

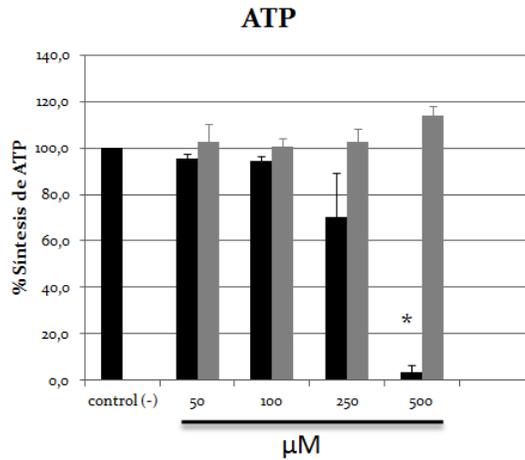


Figura 13. % de síntesis de ATP de células de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico o ácido palmitoleico a diferentes concentraciones (50, 100, 250 y 500 μ M) durante 24 h. n=5 experimentos independientes que se realizaron por duplicado. ANOVA 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p < 0.05$.

6.1.2. Tratamiento de células con lípidos (ácido palmítico y ácido palmitoleico) para análisis por *Western Blot* de Mfn2 y BIP

Una vez conocida la concentración de ácido palmítico que disminuye la viabilidad celular (500 μ M) en nuestra línea celular, se probaron las concentraciones de 50, 100 y 250 μ M para ver su efecto en la síntesis de la proteína Mfn2.

La siguiente imagen de una membrana de *Western Blot* (Fig. 14) nos muestra las diferencias en la síntesis de Mfn2. Los diferentes carriles corresponden a la proteína de las muestras: control (sin tratamiento), 50 μ M, 100 μ M y 250 μ M de ácido palmítico. El carril 4 correspondiente a la concentración de ácido palmítico de 250 μ M presenta una disminución en la densidad óptica (D.O.) de la proteína, tomando en cuenta un control de carga de actina (D.O. de 0.692), con respecto al carril 1 que corresponde al control (D.O. de 1.00).

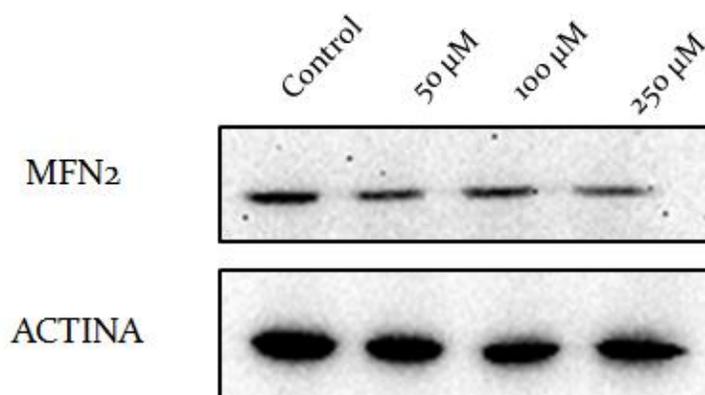


Figura 14. Imagen de una membrana de *Western Blot* que contiene 4 carriles, cada uno representa la D.O. de Mfn2 a las diferentes concentraciones de ácido palmítico administradas a la línea celular. Del carril 1 al carril 4, las muestras son control, 50 μ M, 100 μ M y 250 μ M de ácido palmítico respectivamente, Control de carga de Actina. La D.O. de Mfn2 y actina, fue calculada por el programa *Image J*.

La Tabla 3 muestra el promedio de la D.O. obtenida de Mfn2/Actina por grupo experimental, lo cual es proporcional a la síntesis de Mfn2 en las muestras y su respectiva desviación estándar (SD).

	Ácido palmítico	
	D.O. de Mfn2/Actina	SD
control	1	0.183
50 μ M	1.029	0.182
100 μ M	0.990	0.200
250 μ M	0.692	0.115

Tabla 3. Promedio y SD de la D.O. de Mfn2 comparado contra un control de carga de Actina, de cada una de las muestras tanto control como las tratadas con concentraciones diferentes de ácido palmítico

En la siguiente imagen se representan estos resultados a manera de gráfica, en donde se observa que el ácido palmítico a una concentración de 250 μ M tiende a disminuir ($p=0.1$) la D.O. y por lo tanto la síntesis de la Mfn2 (Fig. 15).

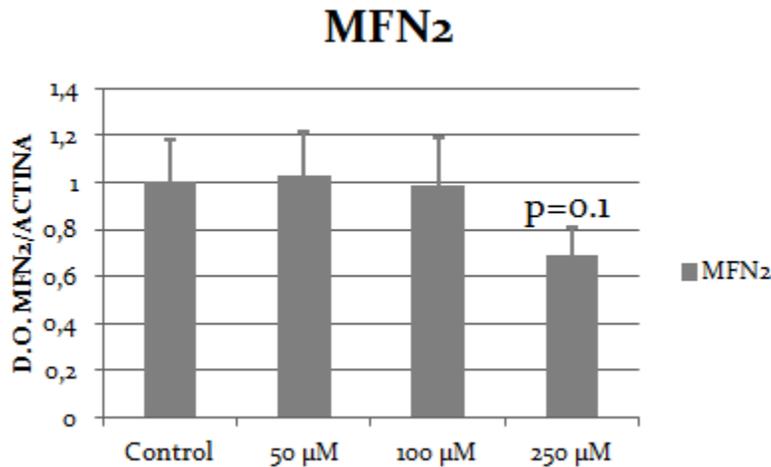


Figura 15. D.O. de la Mfn2/Actina de la línea celular de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico a diferentes concentraciones (50,100 y 250 μ M) durante 12 h. n=5 experimentos independientes. ANOVA 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p<0.05$.

Se realizó el mismo experimento, esta vez para conocer el efecto de las diferentes concentraciones de ácido palmítico sobre la proteína BIP, la cual es un marcador de estrés de RE.

La Fig. 16 muestra la membrana de *Western Blot* en donde se observan las diferencias en la síntesis de BIP. Los diferentes carriles corresponden a la proteína de las muestras: control (sin tratamiento), 50 μM , 100 μM y 250 μM de ácido palmítico. El carril 4 correspondiente a la concentración de ácido palmítico de 250 μM presenta un aumento en la D.O. de BIP, tomando en cuenta un control de carga de actina, (D.O. de 1.545), con respecto al carril 1 correspondiente al control, (D.O. de 1.00).

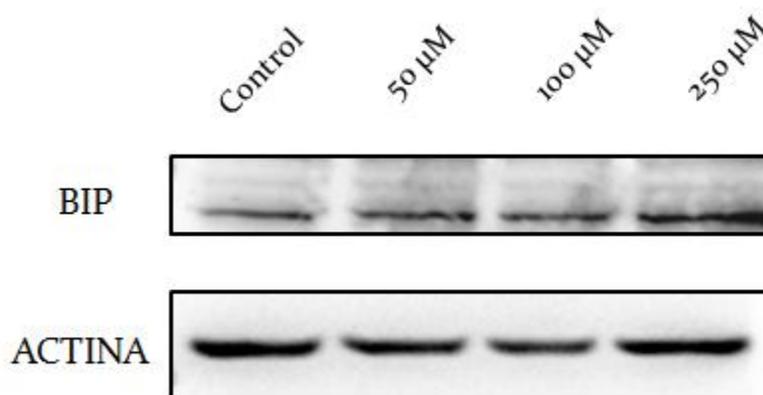


Figura 16. Imagen de una membrana de *Western Blot* que contiene 4 carriles, cada uno representa la D.O. de BIP a las diferentes concentraciones de ácido palmítico administradas a la línea celular. Del carril 1 al carril 4, las muestras son control, 50 μM , 100 μM y 250 μM de ácido palmítico respectivamente. Control de carga de Actina. La D.O. de BIP y actina, fue calculada por el programa *Image J*.

En la Tabla 4 se muestra el promedio de la D.O. obtenida de BIP/Actina por grupo experimental, lo cual es proporcional a la síntesis de BIP en las muestras y su respectiva SD.

	Ácido palmítico	
	D.O. de BIP/Actina	SD
control	1	0.182
50 μ M	1.031	0.069
100 μ M	1.312	0.182
250 μ M	1.545	0.311

Tabla 4. Promedio y SD de la D.O. de BIP, tomando en cuenta un control de carga de Actina, de cada una de las muestras tanto control como las tratadas con concentraciones diferentes de ácido palmítico.

En la siguiente imagen se representan estos resultados a manera de gráfica, en donde se observa que el ácido palmítico a una concentración de 250 μ M tiende a aumentar ($p=0.1$) la D.O. de BIP, es decir se produce un incremento en el estrés de RE (Fig. 15).

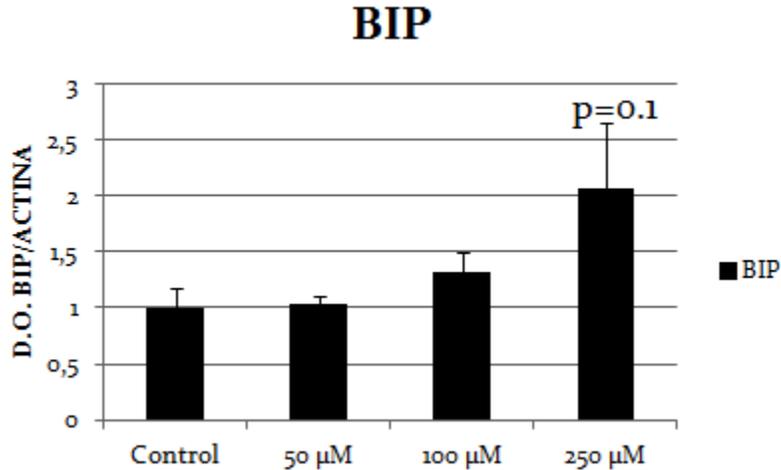


Figura 17. D.O. de BIP/Actina de la línea celular de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico a diferentes concentraciones (50,100 y 250 μ M) durante 12 h. n=5 experimentos independientes. ANOVA 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p<0.05$.

A partir de los resultados anteriores se decidió tomar la concentración de 250 μM de ácido palmítico y comparar contra el ácido palmitoleico, variando el tiempo de exposición de estos lípidos sobre nuestra línea celular y de esta manera analizar la síntesis de la Mfn2.

La Fig. 18 muestra la membrana de *Western Blot* en donde se muestran las diferencias en la D.O. de la Mfn2 en las diferentes muestras tratadas con ácido palmítico o ácido palmitoleico a las diferentes horas de trabajo. Se observa que a partir de las 12 h de exposición, existe un decremento en la D.O. de la Mfn2 (carril 4), tomando en cuenta un control de carga de actina, (D.O. de 0.587) con respecto al control (carril 1) (D.O. de 1.00). Los carriles van del 1 al 9 y están nombrados como se indica a continuación.

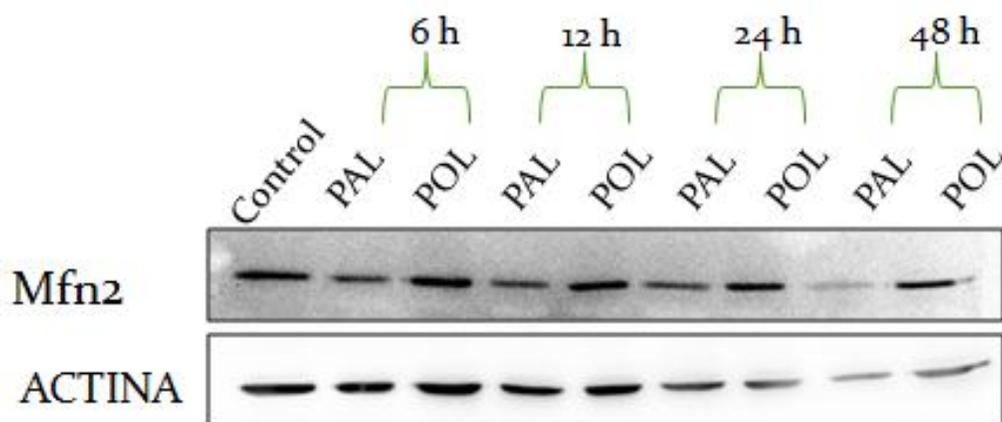


Figura 18. Imagen de una membrana de *Western Blot* dividida en 9 carriles que contiene las diferentes muestras tratadas con ácido palmítico o ácido palmitoleico (250 μM) a tiempos de 6, 12, 24 y 48 h. Control de carga de actina. La D.O. de Mfn2 y Actina, fue calculada por el programa *Image J*.

En la siguiente tabla se muestra el promedio de la D.O. de Mfn2/Actina obtenida por grupo experimental, así como su respectiva desviación estándar (Tabla 5).

	D.O. de Mfn2/Actina			
	Ácido palmítico	SD	Ácido palmitoleico	SD
control	1	0.057	---	---
6 h	0.950	0.126	0.896	0.187
12 h	0.587	0.154	0.775	0.172
24 h	0.550	0.144	0.645	0.168
48 h	0.251	0.082	0.593	0.127

Tabla 5. Promedio y SD de la D.O. de Mfn2 comparado contra un control de carga de Actina, de cada una de las muestras tratadas con los ácidos palmítico y palmitoleico (250 μ M) a diferentes horas.

Los resultados anteriores se representan en la siguiente gráfica (Fig. 19). Se aprecia que el ácido palmítico comparado con el ácido palmitoleico (ambos a 250 μ M) disminuye significativamente ($p < 0.05$) la D.O. de la Mfn2/Actina con respecto al control a partir de las 12 horas de tratamiento y se mantiene hasta las 48 horas.

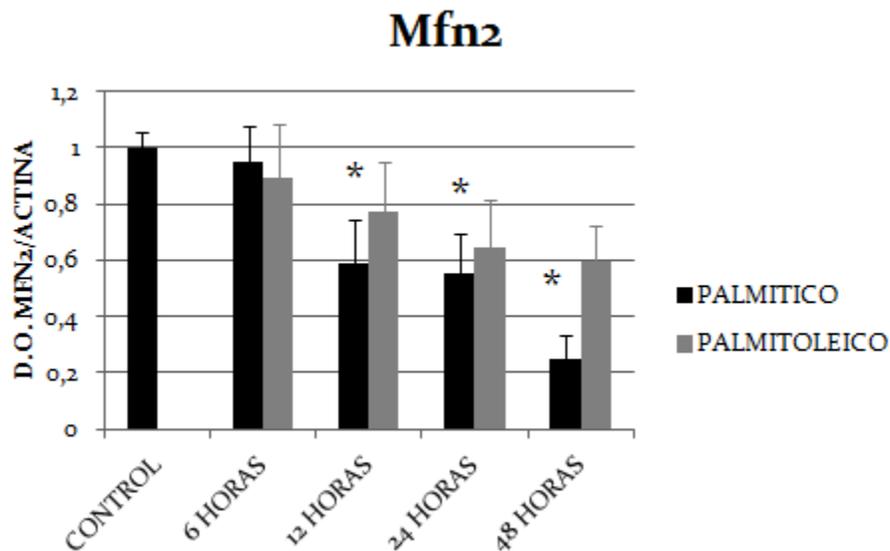


Figura 19. D.O. de la Mfn2/Actina de la línea celular de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico o ácido palmitoleico (250 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. n=5 experimentos independientes. ANOVA de 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p < 0.05$.

De manera similar, en el experimento anterior se analizó la síntesis de BIP, comparando el efecto de ambos lípidos (ácido palmítico y ácido palmitoleico) a diferentes tiempos de exposición con respecto a un control sin tratamiento.

La Fig. 20 muestra una membrana de *Western Blot* en donde se aprecian las diferencias en la síntesis de BIP de acuerdo al tratamiento usado y el tiempo de exposición. Se observa que a las 12 h de exposición con ácido palmítico (carril 4), existe un incremento visible en la D.O. de BIP, tomando en cuenta un control de carga de actina, (D.O. de 1.288), con respecto al control (carril 1) (D.O. de 1.00).

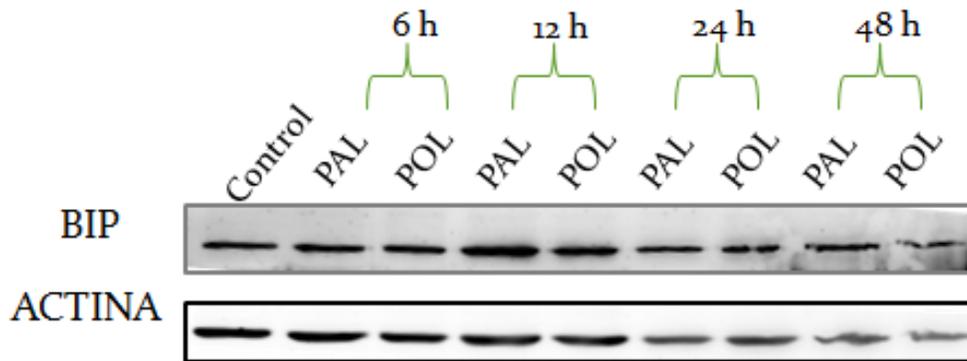


Figura 20. Imagen de una membrana de *Western Blot* dividida en 9 carriles que contiene las diferentes muestras tratadas con ácido palmítico o ácido palmitoleico (250 μ M) a tiempos de 6,12, 24 y 48 h. Control de carga de actina. La D.O. de BIP y Actina, fue calculada por el programa *Image J*.

En la siguiente tabla se muestra el promedio de la D.O. de BIP/Actina obtenida por grupo experimental, así como su respectiva desviación estándar (Tabla 6).

	D.O. de BIP/Actina			
	Ácido palmítico	SD	Ácido palmitoleico	SD
control	1	0.098	---	---
6 h	0.832	0.094	0.970	0.082
12 h	1.288	0.150	1.090	0.152
24 h	1.247	0.173	0.849	0.123
48 h	0.939	0.240	0.553	0.155

Tabla 6. Promedio y SD de la D.O. de BIP comparado contra un control de carga de Actina, de cada una de las muestras tratadas con ácido palmítico y ácido palmitoleico (250 μ M) a diferentes horas.

Los resultados anteriores se representan en la siguiente gráfica (Fig. 21). Se observa que a partir de las 12 horas de exposición el ácido palmítico (250 μ M) a diferencia del ácido palmitoleico produce una tendencia a incrementar ($p=0.2$) la D.O. de BIP/Actina, la cual se mantiene hasta las 24 horas.

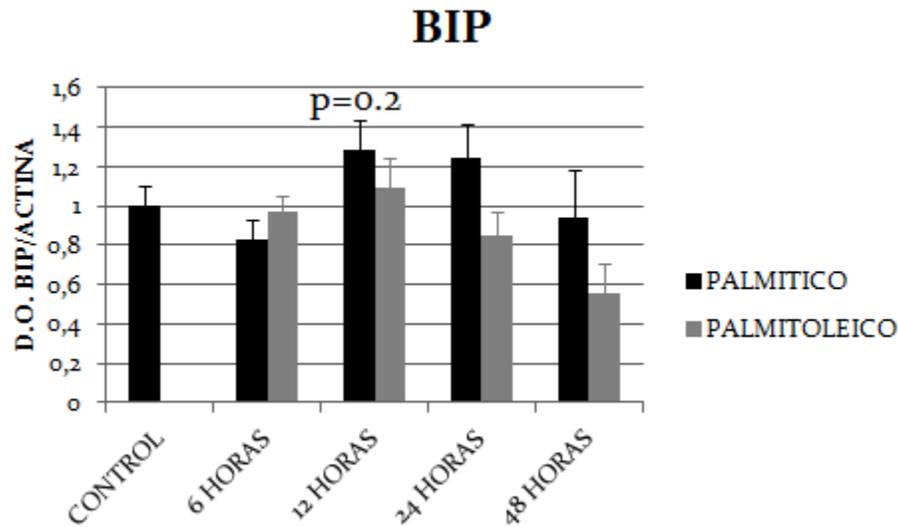


Figura 21. D.O. de BIP/Actina de la línea celular de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico o ácido palmitoleico (250 μ M) durante 6, 12, 24 y 48 h. $n=5$ experimentos independientes. ANOVA de 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p<0.05$.

6.1.3. Tratamiento de células con lípidos (ácido palmítico y ácido palmitoleico) para análisis por *Western Blot* de Fser AKT(S473) y AKT total.

Posteriormente se realizó el siguiente experimento para conocer en nuestra línea celular, el efecto de ambos lípidos (250 μ M) sobre la sensibilidad a la insulina, variando los tiempos de exposición. Lo anterior, a partir del análisis de la síntesis de la proteína FserAKT (S473) comparada con la proteína AKT total y un control de carga de actina.

La Figura 22 muestra una membrana de *Western Blot* en donde se aprecia que a partir de las 6 horas de exposición con el ácido palmítico y el ácido palmitoleico a una concentración de 250 μ M, producen una disminución visible en la D.O. (carril 3 y 4) de la FserAKT (S473) con respecto al control (carril 2) y esta se mantiene hasta las 24 horas de exposición (carriles 5-8). Los valores numéricos de la D.O. se presentan en la Tabla 7.

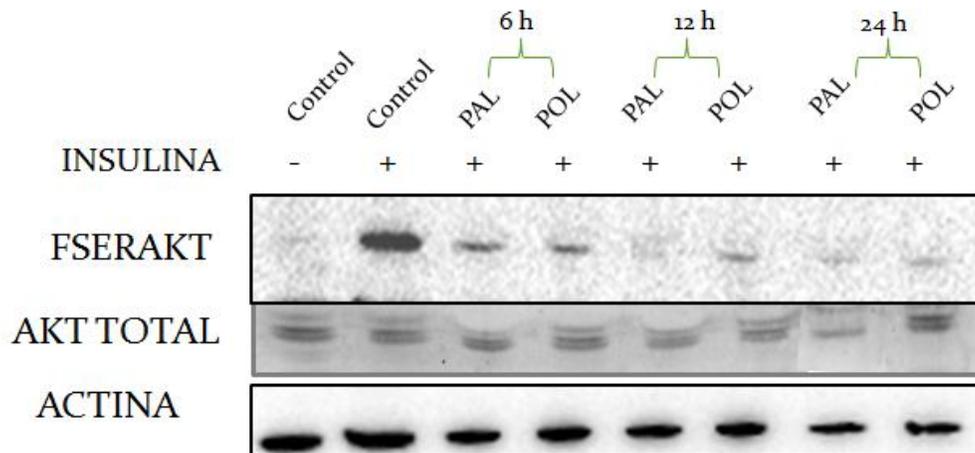


Figura 22. Imagen de una membrana de *Western Blot* dividida en 8 carriles que contiene las diferentes muestras tratadas con ácido palmítico o ácido palmitoleico (250 μ M) a tiempos de 6,12, 24 h. Las muestras fueron expuestas 15 min a la insulina (100nM), con un control sin insulina. Todas las muestras fueron normalizada usando la proteína AKT total y un control de carga de Actina. La D.O. de la FserAKT, AKT total y actina, fué calculada por el programa *Image J*.

	FserAKT/AKT total/actina			
	Ácido palmítico	SD	Ácido palmitoleico	SD
Control sin insulina	0.085	0.038	---	---
Control	1.688	0.435	---	---
6 h	0.677	0.226	0.655	0.268
12 h	0.296	0.064	0.737	0.200
24 h	0.403	0.065	0.551	0.123

Tabla 7. Promedio y SD de la D.O. de FserAKT con respecto a la D.O. del AKT total, ambas comparadas contra un control de carga de Actina. Cada una de las muestras fueron tratadas con ácido palmítico y ácido palmitoleico (250 µM) a diferentes horas.

Los resultados anteriores se muestran de manera de gráfica en la siguiente imagen (Fig. 23), en donde puede visualizarse el efecto que producen ambos lípidos sobre la sensibilidad a la insulina en nuestra línea celular. La disminución a la sensibilidad a la insulina (decremento en la síntesis de FserAKT) es significativa ($p < 0.05$) para ambos lípidos a partir de las 6 h de exposición. De la misma manera se aprecia que a las 12 h de exposición el ácido palmítico afecta en mayor medida la sensibilidad a la insulina en comparación con el ácido palmitoleico.

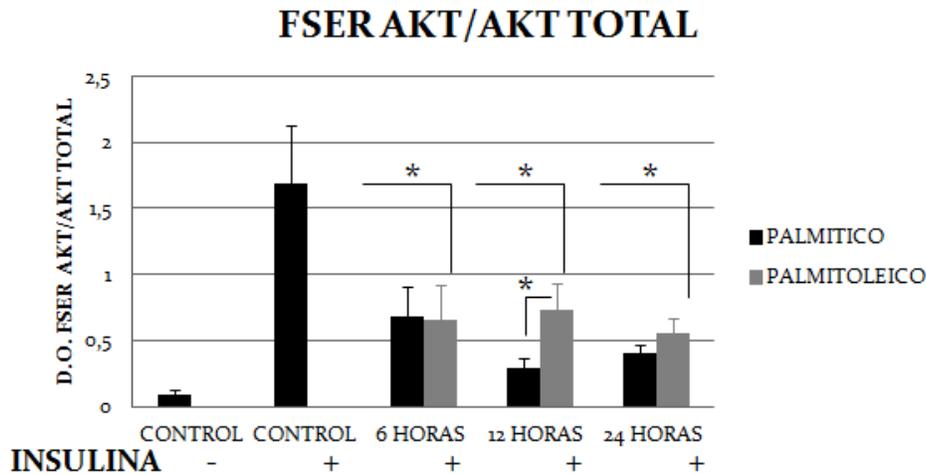


Figura 23. D.O. de FserAKT/AK total tomando en cuenta un control de carga de Actina, de la línea celular de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico o palmitoleico (250 µM) durante 6, 12, 24 h. n=5 experimentos independientes. ANOVA de 2 colas con Test post hoc de Dunnet * $p < 0.05$.

6.2. *In vivo*

6.2.1. Fenotipo obeso en ratones

Continuando con la segunda parte del proyecto, se trabajó con ratones alimentados con dieta alta en grasa y control por 2 períodos de tiempo diferentes (1 mes y 3 meses).

En las siguientes Tablas (8 y 9) se muestra el peso de los ratones de los grupos experimentales alimentados con dieta alta en grasa y control, por 1 mes y 3 meses.

Peso (g) por Semana						
		1	2	3	4	5
Control	23.00	22.83	23.67	23.17	24.67	24.83
Grasa	21.67	25.17	26.00	26.83	27.33	27.50
SD Control	1.291	0.477	0.494	0.792	1.054	1.014
SD Grasa	0.667	0.307	0.258	0.167	0.211	0.224

Tabla 8. Peso en gramos y desviación estándar (SD) del grupos de ratones alimentados con dieta alta en grasa y dieta control por 1 mes.

Peso (g) por Semana						
		1	2	3	4	5
Control	24.03	25.13	25.73	26.38	27.50	28.30
Grasa	23.57	24.77	26.87	28.23	29.23	33.60
SD Control	1.08	1.07	0.93	0.18	0.18	0.88
SD Grasa	0.52	0.58	0.44	0.67	0.55	2.62

Peso (g) por Semana								
	6	7	8	9	10	11	12	13
Control	28.58	28.73	29.45	29.58	29.85	30.68	29.45	30.50
Grasa	36.20	37.70	38.13	43.20	45.80	46.93	47.83	48.77
SD Control	0.96	0.81	0.21	0.27	0.32	1.60	0.20	0.25
SD Grasa	2.48	3.35	0.96	2.14	1.77	1.58	1.57	1.33

Tabla 9. Peso en gramos y SD del grupos de ratones alimentados con dieta alta en grasa y dieta control por 3 meses.

Los resultados anteriores se representan en las siguientes gráficas (Fig. 24). En donde se puede apreciar que la dieta alta en grasa produce aumento significativo ($p < 0.05$) en el peso del grupo de ratones de 1 mes (a partir de la semana 1) y 3 meses (a partir de la semana 6).

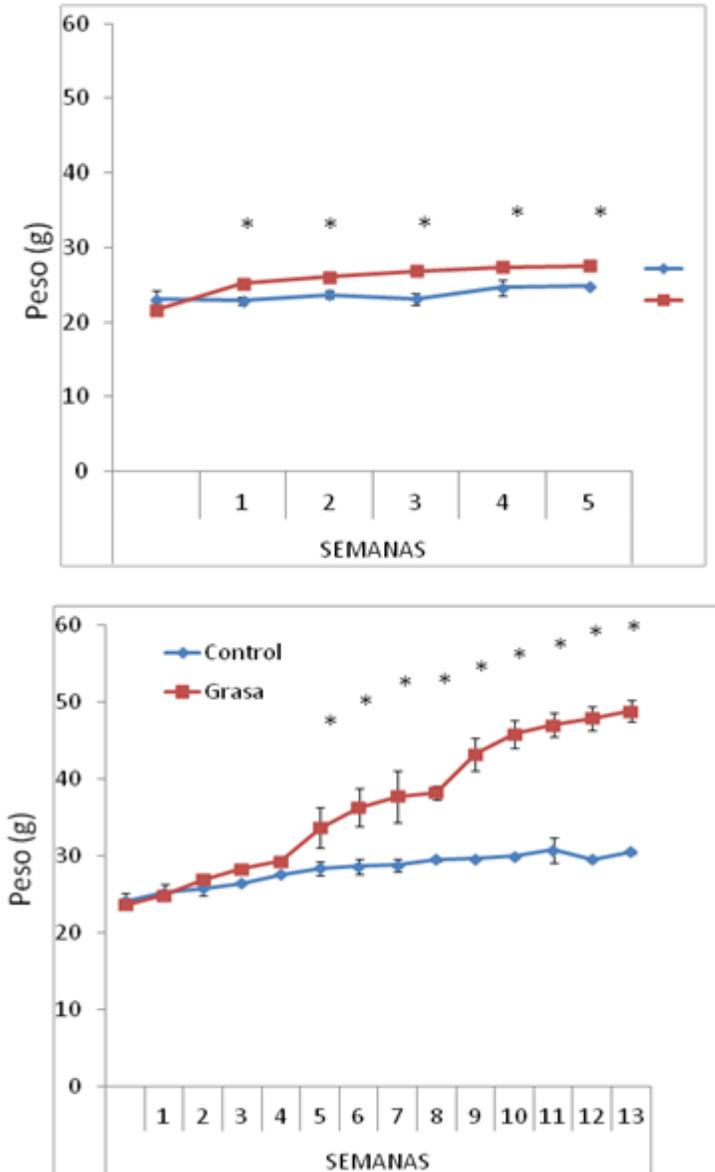


Figura 24. Peso semanal de grupo de ratones de 1 mes y de 3 meses. $n = 5-8$ ratones/grupo. Prueba T de student de 2 colas para muestras independientes comparando grupos obesos vs controles/ semana con una $*p < 0.05$.

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio de la glucosa de los grupos experimentales de ratones (Tabla 10). Se aprecia que la dieta alta en grasa en ratones durante 3 meses con respecto a la dieta control, produce incremento significativo en los niveles de glucosa (Fig. 25).

	Glucosa (mg/dL)			
	1 mes		3 meses	
	Promedio	SD	Promedio	SD
controles	277.20	48.41	339.93	59.44
obesos	265.67	20.44	509.02	34.98

Tabla 10. Valores promedio de Glucosa (mg/dL) y SD de los grupos experimentales de ratones. La medición se realizó al término del período de dieta.

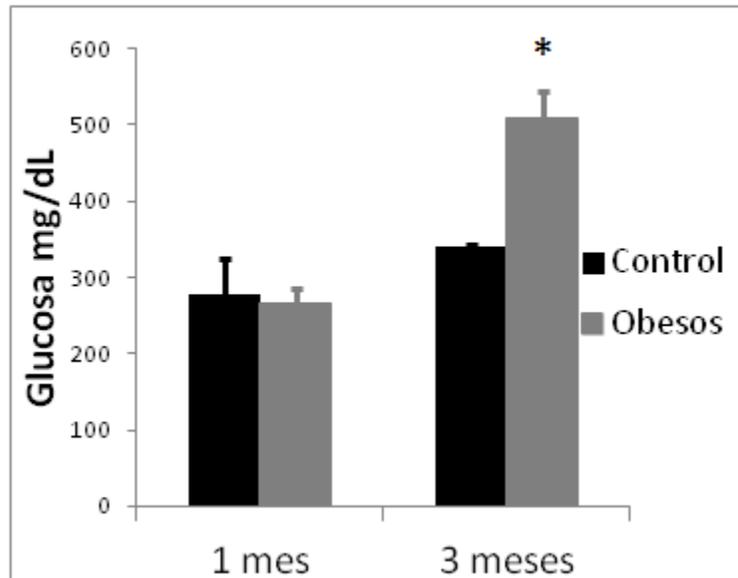


Figura 25. . A. Niveles de glucosa en sangre mg/dL para grupos de ratones controles y obesos de 1 y 3 meses. n=5-8 ratones/grupo. Prueba T de student de 2 colas para muestras independientes comparando grupos obesos vs controles de 1 mes y grupos obesos vs controles de 3 meses con una *p<0.05.

De la misma manera, con la colaboración de I del Dr. Armando Tovar y el Dr. Iván Torre-Villalvazo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se midieron los valores de insulina y colesterol (Fig. 26), obteniendo de esta manera las siguiente gráficas, en donde se puede apreciar que el grupo de ratones obesos de 3 meses presentan un aumento significativo en los niveles de insulina y colesterol.

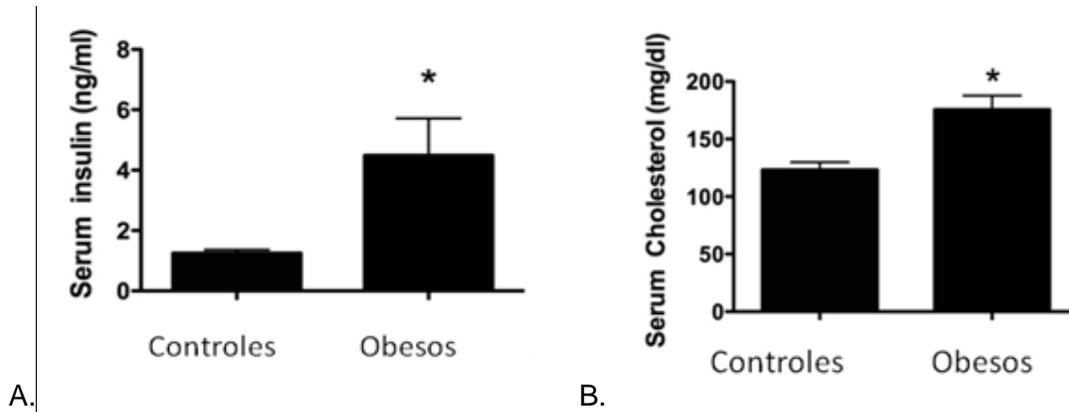


Figura 26. Niveles de insulina (A) y colesterol (B) en suero en grupo de ratones controles y obesos de 3 meses. n=5-8 ratones/grupo. Prueba T de student de 2 colas para muestras independientes comparando grupos obesos vs controles de 1 mes y grupos obesos vs controles de 3 meses con una * $p < 0.05$.

6.2.2 Western Blot de muestras de hipotálamo de ratón para Mfn2

Una vez establecido un fenotipo de obesidad y resistencia a insulina en nuestros modelos experimentales, se procedió a obtener el hipotálamo de los ratones y procesar las muestras para analizar la síntesis de la Mfn2.

Primeramente se analizó la síntesis de Mfn2 en el núcleo arcuato del hipotálamo. En la siguiente membrana de *Western Blot* se puede visualizar un aumento en la D.O. de la Mfn2 (carril 2), tomando en cuenta su control de carga de actina, en el grupo de ratones alimentado con dieta grasa por 1 mes, con respecto al control (carril 1). Por el contrario los grupos de ratones de 3 meses no producen cambios visibles en la síntesis de la Mfn2, comparando controles contra obesos (carril 3 y 4). Los valores numéricos se presentan en la Tabla 11.

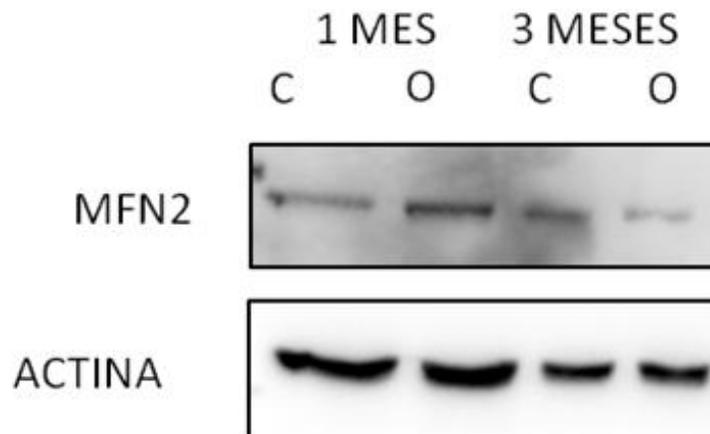


Figura 27. D.O. de Mfn2 tomando en cuenta control de carga de actina, en el núcleo arcuato de ratones control y obesos de 1 y 3 meses. La D.O. de la Mfn2 y Actina (control de carga) fue calculada por el programa *Image J*.

	Mfn2/Actina núcleo arcuato			
	1 mes		3 meses	
	D.O.	SD	D.O.	SD
controles	0.755	0.157	0.554	0.113
obesos	1.118	0.196	0.395	0.104

Tabla 11. Promedio y SD de la D.O. de Mfn2 en el núcleo arcuato, tomando en cuenta un control de carga de Actina, de los grupos experimentales de 1 mes y 3 meses alimentados con dieta alta en grasa o control.

Los resultados anteriores son representados en la siguiente gráfica (Fig. 28), en donde se observa que el grupo de obesos de 1 mes aumenta la D.O. de Mfn2/Actina significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control del mismo grupo. Ambos grupos de ratones de 3 meses no presentan diferencias significativas.

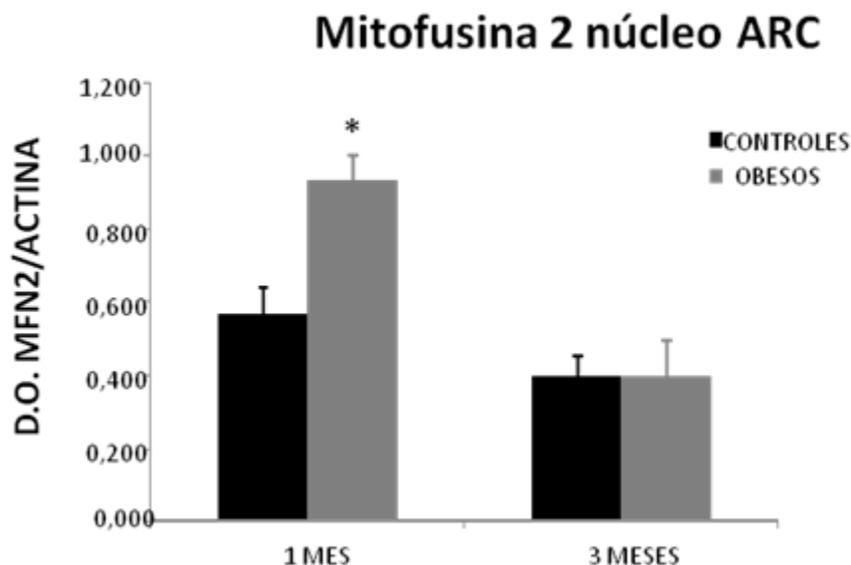


Figura 28. D.O. de Mfn2/Actina en el núcleo arcuato de ratones alimentados con dieta grasa y control durante 1 mes y 3 meses = 5-8 ratones/grupo. Prueba T de student de 2 colas para muestras independientes comparando grupos obesos vs controles de 1 mes, grupos obesos vs controles de 3 meses, grupo control 1 mes vs obesos y controles 3 meses y grupo obeso 1 mes vs obesos y controles de 3 meses con una $*p < 0.05$.

Por otro lado se analizó la síntesis de Mfn2 en el núcleo dorsomedial. En la siguiente membrana de *Western Blot* (Fig. 29) se observa que los ratones alimentados con dieta alta en grasa y control durante 3 meses presentan decremento visible en la D.O. de los niveles de Mfn2 (carril 3 y 4), tomando en cuenta un control de carga de actina, con respecto al grupo de ratones de 1 mes. Los niveles de Mfn2 en los ratones de 1 mes de ambas dietas no presentan cambios visibles en la D.O. (carril 1 y 2). Los valores numéricos de la D.O. se presentan en la Tabla 12.

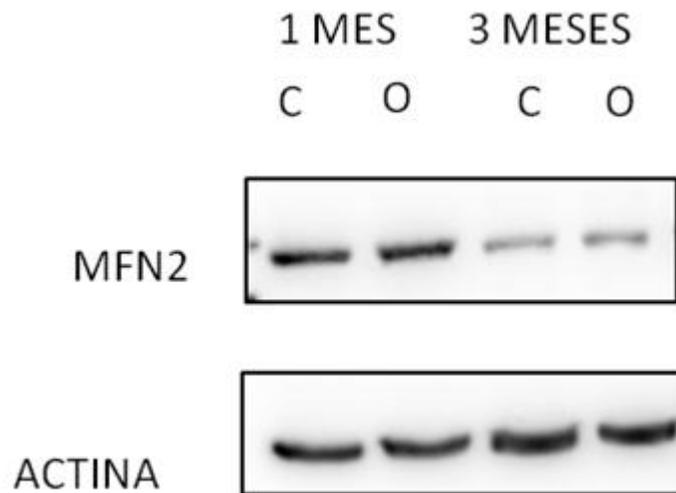


Figura 29. D.O. de Mfn2/Actina en el núcleo dorsomedial de ratones alimentados con dieta grasa y control durante 1 mes y 3 meses. La D.O. de la Mfn 2 y Actina fue calculada por el programa *Image J*.

	Mfn2/Actina núcleo dorsomedial			
	1 mes		3 meses	
	D.O.	SD	D.O.	SD
controles	0.904	0.231	0.650	0.151
obesos	1.041	0.083	0.553	0.115

Tabla 12. Promedio y SD de la D.O. de Mfn2 en el núcleo dorsomedial, tomando en cuenta un control de carga de Actina, de los grupos experimentales de 1 mes y 3 meses alimentados con dieta alta en grasa o control.

Los resultados anteriores los representados en la siguiente gráfica (Fig. 30), en donde se aprecia que los ratones alimentados con dieta alta en grasa y control del grupo de 3 meses disminuyen significativamente ($p < 0.05$) la D.O. de la Mfn2/Actina con respecto a los grupos de 1 mes.

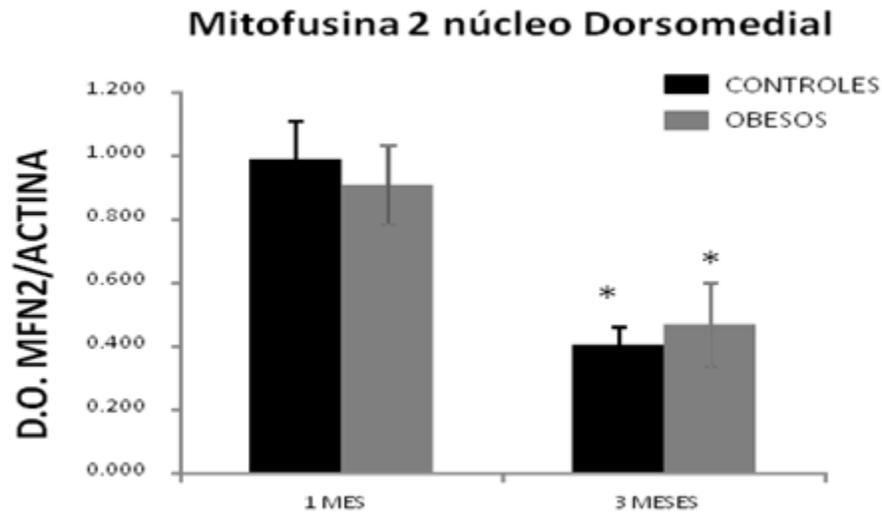


Figura 30. D.O. de Mfn2/Actina en el núcleo dorsomedial de ratones alimentados con dieta grasa y control durante 1 mes y 3 meses = 5-8 ratones/grupo. Prueba T de student de 2 colas para muestras independientes comparando grupos obesos vs controles de 1 mes, grupos obesos vs controles de 3 meses, grupo control 1 mes vs obesos y controles 3 meses y grupo obeso 1 mes vs obesos y controles de 3 meses con una $*p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN

7.1 Modelo *in vitro*

Se conoce que en pacientes obesos y con diabetes mellitus tipo 2 así como en *modelos in vivo* e *in vitro*, los lípidos saturados como el ácido palmítico, generan efectos tóxicos en la fisiología celular incluyendo alteraciones en la función de la mitocondria y activación del estrés de RE que conllevan a la generación de RI. A pesar de que se conoce el efecto tóxico de los lípidos sobre ciertas proteínas, a la fecha no ha sido posible controlar o mejorar la RI a través de la administración farmacológica. En este sentido es importante ampliar el estudio del efecto perjudicial de los lípidos saturados sobre blancos moleculares, con el fin de caracterizar nuevos candidatos con beneficio potencial a la salud. Uno de los candidatos propuestos en esta tesis es la proteína Mfn2. La Mfn2 se encuentra en la región de las MAMs la cual interactúa física y funcionalmente con el RE y la mitocondria. La Mfn2 es un candidato altamente potencial en la coordinación del metabolismo energético en parte debido a que varias investigaciones han comprobado que diversas especies de lípidos afectan la región de las MAMs [64] y que la deficiencia de Mfn2 genera estrés de RE [77, 80] y resistencia a la leptina [80]. De esta manera nuestra hipótesis era que la exposición a lípidos saturados producirá la disminución en los niveles de la Mfn2, generando estrés de RE y favoreciendo la RI.

Para comprobar nuestra propuesta nos planteamos 3 objetivos, el primero de ellos fue identificar en un modelo *in vitro* el efecto del lípido saturado ácido palmítico para promover cambios en la expresión de la Mitofusina 2 y la activación del estrés del retículo endoplásmico, y correlacionarlo con la sensibilidad a la insulina. Para ello primeramente se estableció la concentración óptima de ácido palmítico para trabajar a partir de ensayos de viabilidad celular de MTT y ATP. Los resultados nos indican que el tratamiento con ácido palmítico a la concentración de 250 μM durante 24 h promueve toxicidad parcial en las células, sin presentar cambios significativos, mientras que a la concentración de 500 μM el % de reducción de MTT decrece significativamente. Lo anterior correlaciona con el decremento significativo en la concentración de ATP empleando 500 μM de ácido palmítico. Por su parte, la incubación con ácido palmitoleico no genera el decremento en la reducción de MTT ni presenta alteraciones aparentes en los niveles de ATP.

Investigaciones recientes han demostrado el efecto tóxico del ácido palmítico sobre distintas líneas celulares de páncreas, corazón, hígado, músculo esquelético y células

neuronales que activan tanto las vías de inflamación como de apoptosis y conllevan a la muerte celular, lo cual correlaciona con nuestros resultados. [15, 42, 58, 82-84].

Asimismo, Mayer et al. 2010 y Yang et al. 2012 [15, 58], demostraron que concentraciones de 200 μM de ácido palmítico no comprometen la viabilidad celular mientras que a concentraciones de 700 μM o 1000 μM causan muerte celular. Este resultado concuerda con nuestra estrategia experimental apoyando el uso de la dosis empleada en nuestro estudio.

Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con ácido palmítico durante 12 h empleando concentraciones de 50 y 100 μM no afectan la expresión de Mfn2 y BIP (marcador de estrés de RE) comparado con el control. Mientras que la concentración de 250 μM reduce la expresión de Mfn2 e incrementa parcialmente la expresión de BIP. Al comparar el efecto temporal de 250 μM de ácido palmítico sobre los niveles de Mfn2 y activación del estrés de RE, los resultados indican que, a diferencia del ácido palmitoleico, la incubación con ácido palmítico por 12 h disminuye significativamente la expresión de Mfn2. El efecto se conserva hasta las 48 h de estimulación. Por su parte, y a diferencia del ácido palmitoleico, la estimulación con ácido palmítico durante 12 h parece incrementar la expresión de BIP con respecto al control, efecto tal que mantiene hasta las 24 h y comienza su decremento a las 48 h, atribuible a la muerte de las células debido al largo período de exposición. Sin embargo el experimento no arrojó significancia estadística por lo cual se requiere aumentar el número de experimentos. Lo anterior correlaciona con lo reportado por Schneeberger et al. 2013, demostrando que la delección del gen de la Mfn2 en ratones incrementa los marcadores de estrés del RE con excepción de BIP [80]. Apoyando esta idea Mayer et al. 2010 evidenciaron estrés del RE producido por ácido palmítico a una concentración de 200 μM en células neuronales (línea celular mHypoE-44) durante 11 h de tratamiento a partir de un incremento en la expresión de eIF2 α y del splicing de XBP-1. Lo anterior fundamenta la idea de que se requiere del análisis de marcadores adicionales para evidenciar la activación del estrés de RE en nuestro modelo.

Hasta el momento, desconocemos si la disminución en la expresión de Mfn2 se produce por el incremento en el estrés de RE o si el estrés de RE es el iniciador de la deficiencia de Mfn2. Lo anterior forma parte de futuros experimentos.

Interesantemente, los resultados mostraron que, la incubación con el ácido palmítico y el palmitoleico disminuyen la fosforilación de AKT en serina (marcador de RI) a partir de las 6 h de tratamiento, efecto que se mantiene hasta las 24 h posteriores al tratamiento.

Es importante señalar que ninguno de los lípidos produce disminución en la expresión de Mfn2 o activación del estrés de retículo endoplásmico al tiempo de 6 h, por lo que proponemos que a tiempos tempranos de tratamiento la resistencia a la insulina se produce por mecanismos adicionales a la modulación de la expresión de Mfn2 o de la activación del estrés del retículo endoplásmico. Apoyando nuestra propuesta, Mayer et. al. 2010 [15] proponen a la proteína JNK como causante del estrés de retículo endoplásmico en células neuronales tratadas con ácido palmítico (200 μ M) y que su activación es a partir de las 4 h post-tratamiento. De la misma manera Yang et. al. 2012 y Nie Q et. al. 2014 [58, 79] demuestran que el ácido palmítico incrementa la fosforilación de JNK en líneas celulares de músculo esquelético.

Sin embargo, a tiempos tardíos (12 h) el ácido palmítico a diferencia del ácido palmitoleico produce el incremento en la RI, lo cual correlaciona con el decremento de la expresión de Mfn2 y la activación del estrés del RE. Lo anterior confirma nuestra hipótesis proponiendo que la modulación a la baja de la Mfn2 es relevante en la susceptibilidad para presentar RI (Fig. 24). Concordando con nuestros hallazgos, Sebastián et al. 2012 y Schneeberger et al. 2013 [77, 80] proponen que la ausencia de Mfn2 en modelos *in vivo* de ratones está ampliamente relacionada con RI, y que la sobreexpresión de esta proteína contribuye en parte al mejoramiento de las alteraciones metabólicas producidas mediante el aumento en la sensibilidad a la insulina

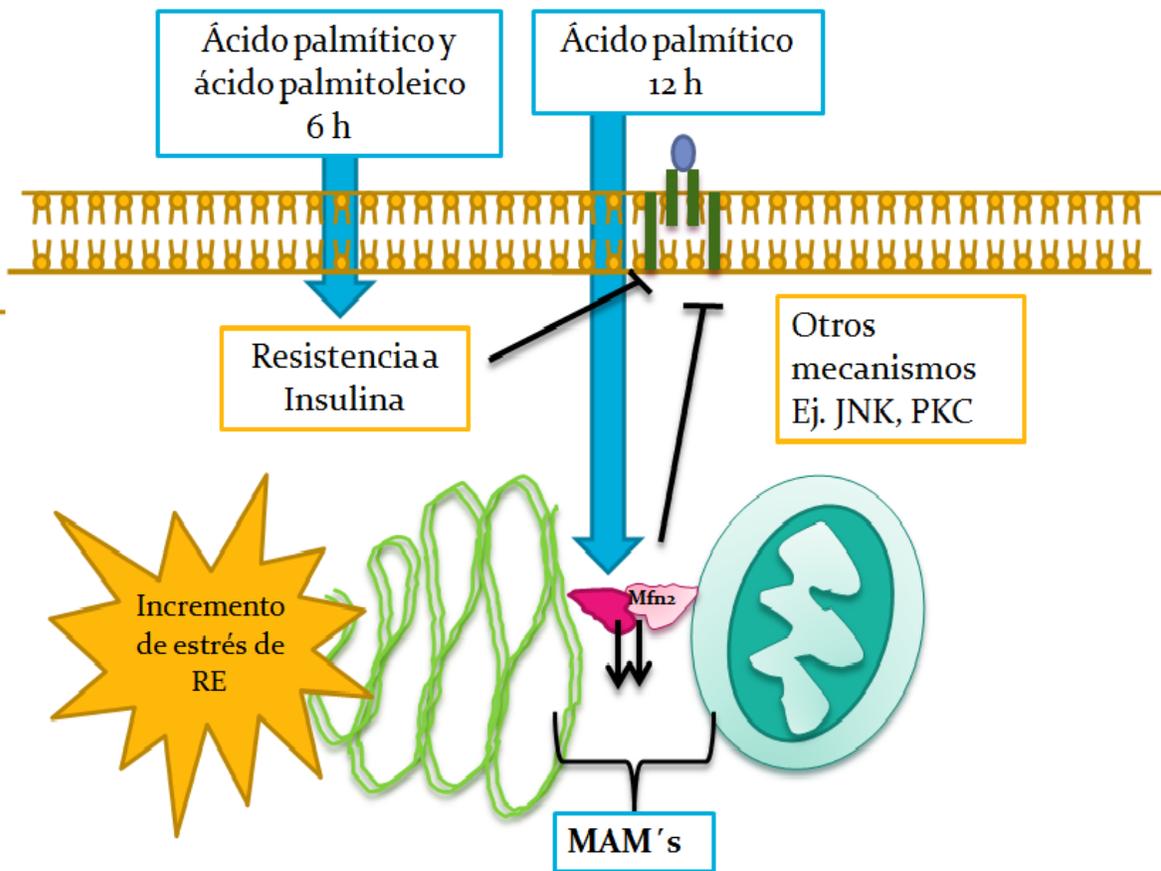


Figura 31. Esquema de resultados *in vitro*.

7.2 Modelo *in vivo*

Hasta el momento nuestro modelo *in vitro* demuestra que el ácido palmítico tiene un efecto sobre la expresión de Mfn2 y que produce alteraciones metabólicas que promueven la RI. Recapitulando lo obtenido en el modelo *in vitro*, se empleó un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa (45% de la Kcal de grasa de la manteca de puerco) durante 1 y 3 meses. Cabe señalar que uno de los principales componentes de la manteca de puerco es el ácido palmítico. En este sentido, analizamos si la dieta alta en grasa reproducía el decremento de la Mfn2 y el parcial incremento de BIP demostrado *in vitro*.

Los resultados mostraron que la ingesta de la dieta alta en grasa durante 3 meses promueve incremento en los niveles de glucosa, insulina y colesterol comparados con los ratones control de 1 y 3 meses de edad. Estos datos nos indican que la dieta grasa por 3

meses induce obesidad y perfil diabético en estos ratones. Nuestro modelo correlaciona con lo reportado por otros investigadores [36, 80].

Una vez establecido el perfil diabético en nuestros modelos *in vivo*, se procedió a analizar la expresión de Mfn2 en el hipotálamo de estos ratones para comprobar que la RI que presentan estos ratones estaba correlacionada con una disminución en la expresión de Mfn2. Es importante recordar en este punto que el hipotálamo está conformado por distintos núcleos, de los cuales el núcleo arcuato y el dorsomedial participan en la homeostasis general de glucosa así como en el balance energético, por lo que es importante establecer en ambos núcleos si la dieta alta en grasa afecta la expresión de Mfn2.

Para determinar si la dieta alta en grasa afectaba la expresión de Mfn2 de la misma manera que se mostró en los modelos *in vitro*, se disectaron los núcleos arcuato y dorsomedial.

Al analizar el efecto de la dieta alta en grasa sobre la expresión de Mfn2 y del marcador BIP en el núcleo arcuato y dorsomedial del hipotálamo encontramos que la ingesta de dieta alta en grasa por 1 mes producía el incremento en la expresión de Mfn2 en el núcleo arcuato. Sin embargo la ingesta de la dieta alta en grasa por 3 meses no parece modular la expresión de Mfn2. Lo anterior rechaza la hipótesis que planteamos que proponía a la obesidad como causa del decremento de la Mfn2. No existen hasta el momento referencias bibliográficas que apoyen estos resultados. En este sentido proponemos que pudieran estar implicados mecanismos de respuesta al aumento en la carga de lípidos que conlleve al aumento en la expresión de Mfn2, ya que finalmente esta proteína es clave en el funcionamiento mitocondrial, organelo que se encarga de realizar la β -oxidación de los lípidos [78, 85, 86]. Por su parte, otros estudios demuestran que la ingesta de una dieta de 60% de grasa promueve la disminución en los niveles de Mfn2 en músculo esquelético de ratas [77, 78]. En este sentido el porcentaje de grasa administrada a nuestros modelos (45% de grasa) pudiera influir en la expresión de Mfn2 así como con la RI demostrada con los resultados que obtuvimos. Lo anterior requiere ser investigado en estudios posteriores.

Por otro lado, nuestros datos demuestran que los niveles de la Mfn2 decrecen en los núcleos del hipotálamo en la etapa adulta. Este resultado no se encuentra reportado a la fecha y podría ser parte de un nuevo proyecto de investigación con enfoque en el

envejecimiento y la demencia, debido a que está ampliamente reportado que la obesidad, hiperinsulinemia y daño a la tolerancia a la glucosa favorece la neurodegeneración o pérdida en la sinapsis de las neuronas, responsables de los síntomas presentados durante el declive cognitivo y la demencia [87-89].

8. CONCLUSIÓN

En el presente proyecto se demostró que la hiperlipidemia inducida por ácido palmítico *in vitro* decrece los niveles de Mfn2 contribuyendo en parte al desarrollo de resistencia a la insulina. Asimismo, se identificó que una sola insaturación del ácido palmítico (ácido palmitoleico), previene de la muerte neuronal y favorece la sensibilidad a la insulina.

9. PERSPECTIVAS

- Identificar si la estimulación con ácido palmítico *in vitro* promueve en primera instancia: 1) decremento de Mfn2, ó 2) incremento del estrés de retículo endoplásmico.
- Definir la participación de la mitocondria durante la modulación de los niveles de la Mfn2 sobre la resistencia a insulina.
- Determinar los mecanismos moleculares que influyen en la generación de resistencia a la insulina *in vitro* a tiempos tempranos (JNK, PKC).

9.1. Primera perspectiva

Como adelanto a la primera perspectiva del proyecto, se realizó un experimento manejando las mismas concentraciones de lípidos (250 μ M) a tiempos de 1, 6 y 8 h, para de esta manera poder establecer cual fenómeno se produce en primera instancia si la disminución en la expresión de Mfn2 o la activación de estrés de retículo endoplásmico. Se obtuvo lo siguiente:

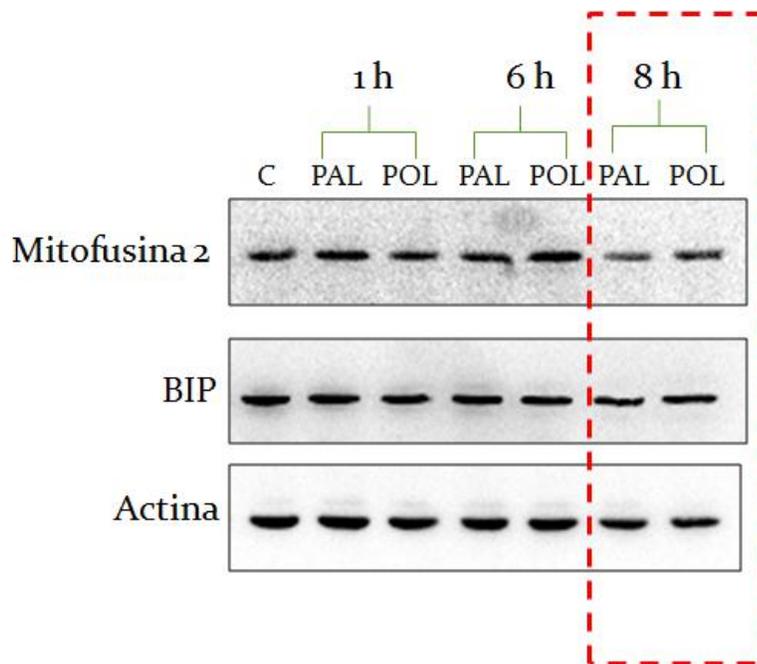


Figura 32. Expresión de Mfn2 y BIP de células de hipotálamo de ratón estimuladas con ácido palmítico y ácido palmitoleico a una concentración de 250 μ M durante 1,6 y 8 h. Control de carga de actina. n=1 experimento.

El resultado muestra una clara disminución en la expresión de Mfn2 al tiempo de 8 h en células tratadas con ácido palmítico a diferencia del ácido palmitoleico. Al mismo tiempo no se observaron cambios en la expresión de BIP con respecto al control. Por lo que este experimento, nos da una clara idea de que la hipótesis propuesta en la que se establece que el ácido palmítico produce disminución en la expresión de Mfn2 lo que a su vez activa el estrés del RE, es acertada. Para verificar estas observaciones es necesario incrementar la cantidad de experimentos y comprobar la reproducibilidad de estos datos y determinar si hay significancia estadística.

10. REFERENCIAS

1. Malik, V.S., W.C. Willett, and F.B. Hu, *Global obesity: trends, risk factors and policy implications*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(1): p. 13-27.
2. Centro de Nutrición, O.y.A.M. *La Obesidad en México*. 2012; Available from: <http://www.abchospital.com/articulos/item/2012/03/12/la-obesidad-en-m%C3%A9xico>.
3. Organization, W.H., *Global Database on Body Mass Index*. 2010-2014: World Health Organization.
4. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
5. David Thompson, J.E., Graham A. Colditz, Amy P. Bird, Gerry Oster, *Lifetime Health and Economic Consequences of obesity*. Archives of Internal Medicine, 1999. **159**: p. 2177-2183.
6. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 338-49.
7. Ünal, D., *Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system*. Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi, 2012. **39**(2): p. 310-315.
8. Vogt, M.C. and J.C. Bruning, *CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(2): p. 76-84.
9. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
10. Cooper, M. and R. Hasuman, *La célula*. 5ta ed, ed. Marbán. 2010. 397-402, 628-629
11. Scheen, A.J., N. Paquot, and P.J. Lefebvre, *[Glucotoxicity and lipotoxicity, two implicated accomplices in the vicious circle of type 2 diabetes]*. Rev Med Liege, 1999. **54**(6): p. 535-8.
12. Scheen, A.J., *From obesity to diabetes: why, when and who?* Acta Clin Belg, 2000. **55**(1): p. 9-15.
13. Kraegen, E.W., et al., *The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001. **109 Suppl 2**: p. S189-201.
14. Yang, M., et al., *Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit*. Lipids in health and disease, 2013. **12**: p. 10.
15. Mayer, C.M. and D.D. Belsham, *Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 576-85.
16. Havrankova, J., J. Roth, and M. Brownstein, *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat*. Nature, 1978. **272**(5656): p. 827-9.
17. van Houten, M. and B.I. Posner, *Cellular basis of direct insulin action in the central nervous system*. Diabetologia, 1981. **20 Suppl**: p. 255-67.
18. Unger, J., et al., *Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain*. Neuroscience, 1989. **31**(1): p. 143-57.
19. Schwartz, M.W., et al., *Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes*. Nature, 2013. **503**(7474): p. 59-66.

20. Brazis, P., J. Masdeu, and J. Biller, *Hypothalamus and pituitary gland*. 4ta ed. 2001: Lippincott Williams & Wilkins
21. Carpenter, M., *El hipotálamo*. 4ta ed. 1994: Neuroanatomía fundamentos. 286-303.
22. Niwunhuys, R., J. Voogd, and C. Van Hujizen, *Diencéfalo hipotálamo*. 4ta ed. 2009: El sistema nervioso central humano. 289-336.
23. Coppola, A. and S. Diano, *Hormonal regulation of the arcuate nucleus melanocortin system*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3519-30.
24. Warne, J.P. and A.W. Xu, *Metabolic transceivers: in tune with the central melanocortin system*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(2): p. 68-75.
25. Clegg, D.J., et al., *Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity*. Physiol Behav, 2011. **103**(1): p. 10-6.
26. Filippi, B.M., et al., *Insulin and glucagon signaling in the central nervous system*. Rev Endocr Metab Disord, 2013. **14**(4): p. 365-75.
27. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *It's not how fat you are, it's what you do with it that counts*. PLoS Biol, 2008. **6**(9): p. e237.
28. Liu, L., et al., *Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1679-89.
29. Cnop, M., et al., *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities*. Diabetes, 2005. **54**: p. S97-107.
30. Schulze, P.C., *Myocardial lipid accumulation and lipotoxicity in heart failure*. J Lipid Res, 2009. **50**(11): p. 2137-8.
31. Medina-Gomez, G., S. Gray, and A. Vidal-Puig, *Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1)*. Public Health Nutr, 2007. **10**(10A): p. 1132-7.
32. Akhmedov, D. and R. Berdeaux, *The effects of obesity on skeletal muscle regeneration*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 371.
33. Yang, J., J. Kang, and Y. Guan, *The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes*. Front Med, 2013. **7**(4): p. 433-44.
34. Posey, K.A., et al., *Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(5): p. E1003-12.
35. Bi, L., et al., *Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice*. J Lipid Res, 2013. **54**(10): p. 2754-62.
36. Benoit, S.C., et al., *Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents*. J Clin Invest, 2009. **119**(9): p. 2577-89.
37. Ye, J., *Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle*. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 65-74.
38. Balasubramanyam, M., R. Lenin, and F. Monickaraj, *Endoplasmic reticulum stress in diabetes: New sights of clinical relevance*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2010. **25**(2): p. 111-118.
39. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
40. Laybutt, D.R., et al., *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 752-63.

41. Biden, T.J., et al., *Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(8): p. 389-98.
42. Park, M., et al., *Palmitate induces ER stress and autophagy in H9c2 cells: implications for apoptosis and adiponectin resistance*. J Cell Physiol, 2014.
43. Chen, Y.Y., et al., *Palmitate induces autophagy in pancreatic beta-cells via endoplasmic reticulum stress and its downstream JNK pathway*. Int J Mol Med, 2013. **32**(6): p. 1401-6.
44. Li, H., et al., *AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(9): p. 1844-54.
45. Cai, N., et al., *Autophagy protects against palmitate-induced apoptosis in hepatocytes*. Cell Bioscience, 2014. **4**(28).
46. Liu, Y.M., et al., *Wogonin ameliorates lipotoxicity-induced apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells via interfering with DAG-PKC pathway*. Acta Pharmacol Sin, 2011. **32**(12): p. 1475-82.
47. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 528-31.
48. Higuchi, S., et al., *Hypothalamic 2-arachidonoylglycerol regulates multistage process of high-fat diet preferences*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38609.
49. Kim, J.A., Y. Wei, and J.R. Sowers, *Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 401-14.
50. Grimm, S., *The ER-mitochondria interface: the social network of cell death*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(2): p. 327-34.
51. Hernandez-Beltran, N., C.B. Moreno, and A.M. Gutierrez-Alvarez, *Contribution of mitochondria to pain in diabetic neuropathy*. Endocrinol Nutr, 2013. **60**(1): p. 25-32.
52. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 664-71.
53. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
54. Heilbronn, L.K., et al., *Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(4): p. 1467-73.
55. Hafizi Abu Bakar, M., et al., *Mitochondrial dysfunction as a central event for mechanisms underlying insulin resistance: the roles of long chain fatty acids*. Diabetes Metab Res Rev, 2014.
56. Kelley, D., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**: p. 2944-2950.
57. Minet, A.D. and M. Gaster, *ATP synthesis is impaired in isolated mitochondria from myotubes established from type 2 diabetic subjects*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **402**(1): p. 70-4.
58. Yang, C., et al., *Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells*. Biosci Rep, 2012. **32**(5): p. 465-78.
59. Laurent, D., et al., *Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(5): p. E1169-77.
60. Sparks, L., et al., *A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle*. Diabetes, 2005. **54**: p. 1926-1933.

61. Erion, D.M. and G.I. Shulman, *Diacylglycerol-mediated insulin resistance*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 400-2.
62. Fisher-Wellman, K.H. and P.D. Neuffer, *Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(3): p. 142-53.
63. Yuzefovych, L.V., et al., *Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells*. Endocrinology, 2012. **153**(1): p. 92-100.
64. Tubbs, E., et al., *Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance*. Diabetes, 2014.
65. Poston, C.N., S.C. Krishnan, and C.R. Bazemore-Walker, *In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM)*. J Proteomics, 2013. **79**: p. 219-30.
66. Raturi, A. and T. Simmen, *Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM)*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(1): p. 213-24.
67. Rizzuto, R., et al., *Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(9): p. 566-78.
68. Simmen, T., et al., *Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM)*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(8): p. 1465-73.
69. Zhang, A., et al., *Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(10).
70. Hayashi, T., et al., *MAM: more than just a housekeeper*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 81-8.
71. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 605-10.
72. Zorzano, A., et al., *Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético*. Revista de Medicina de la Universidad de Navarra, 2004. **48**(2): p. 30-35.
73. Chen, H., et al., *Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations*. Cell, 2010. **141**(2): p. 280-9.
74. Munoz, J.P., et al., *Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK*. EMBO J, 2013. **32**(17): p. 2348-61.
75. Hernandez-Alvarez, M.I., et al., *Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1{alpha}/Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity*. Diabetes Care, 2010. **33**(3): p. 645-51.
76. Sano, R., et al., *GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2009. **36**(3): p. 500-11.
77. Sebastian, D., et al., *Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5523-8.
78. Zhang, X., et al., *Mitofusin 2 mediated alleviation of insulin resistance in rats through reduction in lipid intermediate accumulation in skeletal muscle*. Journal of Biomedical Science, 2013. **20**(45).

79. Nie, Q., et al., *Mitofusin 2 deficiency leads to oxidative stress that contributes to insulin resistance in rat skeletal muscle cells*. Mol Biol Rep, 2014.
80. Schneeberger, M., et al., *Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance*. Cell, 2013. **155**(1): p. 172-87.
81. Dietrich, M.O., Z.W. Liu, and T.L. Horvath, *Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity*. Cell, 2013. **155**(1): p. 188-99.
82. Lee, J.H., et al., *Toxicity generated through inhibition of pyruvate carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 is similar to high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity in INS-1 beta cells*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **383**(1-2): p. 48-59.
83. Cao, J., et al., *Saturated free fatty acid sodium palmitate-induced lipoapoptosis by targeting glycogen synthase kinase-3beta activation in human liver cells*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(2): p. 346-57.
84. Patkova, J., M. Andel, and J. Trnka, *Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants*. Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(5): p. 1439-51.
85. Holloway, G.P., et al., *PGC-1alpha's relationship with skeletal muscle palmitate oxidation is not present with obesity despite maintained PGC-1alpha and PGC-1beta protein*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(6): p. E1060-9.
86. Aon, M.A., N. Bhatt, and S.C. Cortassa, *Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 282.
87. Williamson, R., A. McNeilly, and C. Sutherland, *Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem?* Biochem Pharmacol, 2012. **84**(6): p. 737-45.
88. Ghasemi, R., et al., *Brain insulin dysregulation: implication for neurological and neuropsychiatric disorders*. Mol Neurobiol, 2013. **47**(3): p. 1045-65.
89. Wotton, C.J. and M.J. Goldacre, *Age at obesity and association with subsequent dementia: record linkage study*. Postgrad Med J, 2014. **90**(1068): p. 547-51.