

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**TBK1 COMO MODULADORA DE LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS
INFLAMATORIAS EN LA MICROGLÍA DE RATAS WISTAR Y SU EFECTO EN
LA GENERACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2**

PRESENTA

ROGER ALEXIS MALDONADO RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

JUNIO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



TESIS

**TBK1 COMO MODULADORA DE LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS
INFLAMATORIAS EN LA MICROGLÍA DE RATAS WISTAR Y SU EFECTO EN
LA GENERACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2**

PRESENTA

ROGER ALEXIS MALDONADO RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

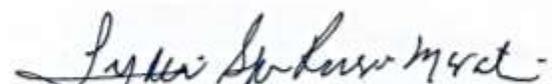
SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JUNIO, 2017

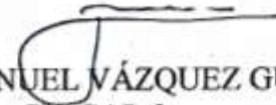
**TBK1 COMO MODULADORA DE LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS
INFLAMATORIAS EN LA MICROGLÍA DE RATAS WISTAR Y SU EFECTO EN
LA GENERACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2**

COMITÉ DE TESIS,


DRA. MA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
PRESIDENTE


DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES
SECRETARIO

DIANA
CABALLERO
DRA. DIANA CABALLERO HERNÁNDEZ
VOCAL 1


DR. JOSÉ MANUEL VÁZQUEZ GUILLÉN
VOCAL 2


DR. RICARDO A. GÓMEZ FLORES
VOCAL 3


DR. ALBERTO CAMACHO MORALES
DIRECTOR EXTERNO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

Junio de 2017

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
FINANCIAMIENTO.....	vii
ÁREA DE TRABAJO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Diabetes mellitus tipo 2, un grave problema de salud.....	4
2.1.1. Control hormonal de la homeostasis de glucosa	4
2.1.2. El sistema nervioso regula la homeostasis de glucosa a través de la acción de la insulina.....	6
2.1.3. Papel del sistema de melanocortinas y de grelina en la activación del sistema nervioso y la regulación de la ingesta de comida y saciedad.....	8
2.1.4. La lipotoxicidad en el contexto de obesidad promueve el desarrollo de resistencia a la insulina y grelina.....	9
2.2. La inflamación sistémica durante la obesidad promueve resistencia a la insulina.....	11
2.2.1. La inflamación del sistema nervioso modula el desarrollo de desórdenes metabólicos relacionados a la resistencia a la insulina y grelina	12
2.2.2. Papel de TANK-BINDING KINASE 1 (TBK1) en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1.1. Objetivo General.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20

6.1.	Material biológico.....	20
6.1.1.	Materiales y reactivos.....	20
6.2.	Estrategia experimental.....	21
6.2.1.	Cultivo celular de microglía	21
6.2.2.	Preparación de las soluciones empleadas en los tratamientos.....	21
6.2.3.	Cuantificación de las citocinas liberadas.....	24
6.2.4.	Determinación de la activación de la vía NF- κ B y TBK1 en células de la microglía.....	25
6.2.5.	Cirugía estereotáxica.....	27
6.2.6.	Curva de tolerancia a la insulina (ITT) y curva de tolerancia a la glucosa (GTT)	28
6.2.7.	Pruebas de sensibilidad a la grelina.....	29
6.2.8.	Análisis estadístico.....	29
7.	RESULTADOS.....	30
8.	DISCUSIÓN.....	39
9.	CONCLUSIONES.....	43
10.	PERSPECTIVAS.....	44
11.	REFERENCIAS.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Homeostasis de glucosa.....	5
2. Núcleos hipotalámicos y regulación de la ingesta de comida por hormonas.....	7
3. Regulación del apetito por la acción de grelina.....	9
4. Fotografía del cultivo primario de la microglía.....	30
5. Secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	31
6. Secreción de la interleucina 6 (IL-6)	32
7. Secreción de la interleucina 1 β (IL-1 β)	33
8. Inmuno blot del cultivo primario de microglía.....	34
9. Corte coronal del cerebro de rata Wistar.....	35
10. Curva de tolerancia a la insulina.....	35
11. Curva de tolerancia a la glucosa.....	36
12. Consumo diario de alimento durante la administración de ácido palmítico, LPS y ACSF por 4 días.....	36
13. Inmuno blot del núcleo arqueado de ratas Wistar administradas con ACSF, lipopolisacárido o ácido palmítico por 4 días. Proporción de cambio en la fosforilación de TBK1.....	37
14. Inmuno blot del núcleo arqueado de ratas Wistar administradas con ACSF, lipopolisacárido o ácido palmítico por 4 días. Proporción de cambio en la fosforilación de NF- κ B.....	38

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Dr. Alberto Camacho Morales por la confianza depositada en mí y por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla por su compromiso e invaluable supervisión en el desarrollo de mi tesis.

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales por sus valiosas observaciones y apoyo.

Dra. Diana Caballero Hernández por su supervisión y ayuda

Dr. José Manuel Vásquez Guillén por sus asesorías y sugerencias

Dr. Ricardo Gómez Flores por sus sugerencias y recomendaciones, así como su apoyo y disposición

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme las instalaciones necesarias para desarrollar este estudio

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización del proyecto de investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme el uso de su equipo y facilitarme un área de trabajo para el desarrollo de este estudio

DEDICATORIA

Soy una persona poco sociable, rara vez me relaciono con los demás y, aun así, nunca he estado solo. Desde el momento de mi nacimiento mi familia me ha acompañado en este viaje, mi madre Mercedes, mi padre Fernando y mis hermanos Ariel y Fernando. Ellos, con su esfuerzo y apoyo me han permitido llegar hasta aquí, sinceramente no creo haber atrevido siquiera a soñar lo que he logrado si ellos no fueran mi familia... Los amo.

Al pasar los años fueron llegando más personas que, a su manera, me ayudaron a sobrellevar desamores, estrés, corajes y aburrimiento; sé que los puedo llamar mis amigos: Roberto, Leonardo, David y Carlos. Aun si la vida nos lleva por caminos distintos siempre recordare las pláticas “filosóficas” a las 4 de la mañana.

No, no me olvide de ti, sé que me matarías si lo hiciera, no sabes cómo cambio mi vida cuando llegaste y lo reconfortante que ha sido tu presencia cuando todo solo parece empeorar. Gracias, eres el motivo por el que me levanto y esta tesis, así como mi corazón es para ti Larisa.

PD: espero que alguien lea esto, no me “partí el lomo” trabajando para que esta tesis termine guardando polvo.

FINANCIAMIENTO

El financiamiento para desarrollar el presente trabajo se obtuvo del CONACYT, como parte de los proyectos Fondo Ciencia Básica 168236 y 255317 y Fondo Sectorial Salud 261420. Además de la obtención de beca de maestría del CONACYT para Roger Alexis Maldonado Ruiz No.573686.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL bajo la dirección de la Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla; así como la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Alberto Camacho Morales.

DR ALBERTO CAMACHO MORALES
DIRECTOR EXTERNO

DRA. MA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
PRESIDENTE

NOMENCLATURA

M	Molaridad
°C	Grados centígrados
cm³	centímetro cúbico
g	Fuerza de gravedad
mL	Militros
µL	Microlitro
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
pH	Potencial de hidrógeno
mV	miliVoltios
CO₂	Dióxido de carbono
H₂O	Agua
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
CaCl₂	Cloruro de calcio
Na	Sodio
KCl	Cloruro de potasio
PBS	Solución buffer de fosfatos
Fc	Fracción cristalizable de un anticuerpo
L-15	Medio de cultivo Leibovitz's
IgG	Inmunoglobulina G
Arc	Núcleo arqueado
Ap	Anteroposterior
Lat	Lateral
DV	Dorsoventral
rpm	Revoluciones por minuto
TBK1	TANK Binding Kinase 1

RESUMEN

La obesidad está relacionada con la presencia de inflamación sistémica crónica y resistencia a la insulina. El desarrollo de inflamación a nivel del sistema nervioso central (SNC) se regula por la microglía. En el presente proyecto empleamos un modelo *in vitro* para determinar si la toxicidad inducida por lípidos correlaciona con el incremento en la producción de citocinas inflamatorias en la microglía en cultivo y si la inducción de inflamación central en ratas Wistar, promueve alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes tipo 2. Se emplearon cultivos primarios de microglía expuestos a lípidos saturados e insaturados para determinar su efecto sobre la liberación de citocinas inflamatorias y su correlación con la activación de la cascada inflamatoria TANK-binding kinase 1-IκB kinase-nuclear factor κ B (TBK1-IKK-NF-κB). Los resultados demuestran que la estimulación de la microglía con el lípido saturado ácido palmítico induce el incremento en la liberación de interleucina 1β (IL-1β), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que correlaciona con la activación de la vía TBK1- NF-κB. Mediante el empleo de cirugía estereotáxica, demostramos que la generación de inflamación intrahipotalámica mediante la administración de ácido palmítico o LPS, no promueven incremento en los niveles de glucosa plasmática, sin embargo, generan el incremento en el consumo de alimento posterior a la administración central de grelina. Nuestros datos demuestran que el daño lipotóxico de los lípidos saturados promueve la activación de inflamación central que se asocia a la alteración en la ingesta de alimento sensible a la hormona grelina.

ABSTRACT

Obesity is associated with chronic systemic inflammation and insulin resistance. Some hypothesis attributes these phenomena to the activation of inflammatory cytokines producing cells. Knowing that obesity-induced systemic inflammation is accompanied by inflammation in multiple brain regions, including the hypothalamus and that the microglia are brain-resident cytokines producing cells here we investigate whether lipid-induced toxicity correlates with an increase in inflammatory cytokine production in Wistar rats microglia cells and if this propitiates type 2 diabetes-related metabolic alterations. To fulfill our approach, we employ primary microglial culture to assess the lipotoxic effect of saturated fatty acids on inflammatory cytokines production and if involves NF- κ B pathway and TANK-binding kinase 1 (TBK1) activation in microglia. To establish cytokine production, we employ ELISA assay and to determinate NF- κ B pathway and TBK1 activation we use Western blot. Stimuli with palmitic acid and stearic acid demonstrated a high interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) production and it correlates with TBK1 activation *in vitro*. Furthermore, we not just observed TBK1 activation but also NF- κ B, in Wistar rats administrated ICV with LPS or palmitic acid; although this was not enough to alter peripheric glucose homeostasis, we observe changes in the food consume prior an administration with ghrelin. Together this data suggests that there is a potentiation to the action of ghrelin in a lipotoxic context.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de obesidad en nuestra población ha constituido un grave problema de salud con base al incremento substancial del número de personas que la padecen. Se estima que existen aproximadamente 1.9 billones de adultos obesos a nivel mundial, siendo México el primer país en el mundo con este mal (WHO, 2014). La presencia de obesidad incrementa el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas crónicas que incluyen, el cáncer, la diabetes, complicaciones cardiovasculares, apnea del sueño, hígado graso no alcohólico y síndrome de ovario poliquístico (Virtue S & Vidal-Puig A, 2008). Evidencias científicas proponen que la acumulación de determinadas especies de lípidos en tejidos no adiposos como el hígado, sistema nervioso central (SNC), células β pancreáticas, etc., promueve efectos tóxicos a través de un proceso conocido como lipotoxicidad (Martínez MPB *et al*, 2010). En este escenario, ciertas especies de lípidos en exceso pueden interactuar con receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4) y desencadenar una respuesta inflamatoria en diversos tejidos, promoviendo resistencia a la insulina en órganos metabólicamente relevantes, incluyendo el SNC (Mowers J *et al*, 2013). Sin embargo, se desconoce qué tipo de lípidos son potencialmente candidatos para activar a los receptores tipo toll (TLRs) en el SNC, modular la producción y liberación de citocinas y si lo anterior contribuye a la generación de diabetes tipo 2. Nuestro grupo de investigación y algunos otros han demostrado que la función de la TBK1 parece ser relevante en el desarrollo de resistencia a la insulina, en particular reportamos que la activación de TBK1 se correlaciona con la disminución de la serina-treonin protein quinasa AKT en las balsas lipídicas de neuronas (Delint RI *et al*, 2015), en donde probablemente induzca la fosforilación en el residuo de serina 994 del receptor de insulina y resistencia a la insulina *in vivo* e *in vitro*, como se ha reportado anteriormente (Muñoz MC *et al*, 2009).

Conociendo que la inflamación sistémica en el contexto de obesidad se acompaña de inflamación en múltiples regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo y que la microglía es el tipo celular que regula la liberación de citocinas en el SNC presente en diversos desórdenes patológicos (Graeber *et al*, 2011), en este trabajo, se plantea la hipótesis de que los ácidos grasos saturados (SFA) activan a la microglía en el hipotálamo promoviendo la secreción de citocinas inflamatorias mediante la activación de TBK1 e incrementando las alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes tipo 2.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus tipo 2, un grave problema de salud

El término diabetes mellitus describe un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglicemia crónica y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas lo que da como resultado defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambos (WHO, 2006). El desarrollo del tipo de diabetes presente en un individuo involucra la alteración de diversos mecanismos moleculares que abarcan desde la destrucción de células β del páncreas mediante procesos autoinmunes, hasta anomalías que culminan en resistencia a la acción de la insulina y que promueven el incremento descontrolado de glucosa en la sangre. La diabetes se clasifica en dos categorías: 1) diabetes mellitus tipo 1, en donde la causa es la deficiencia en la secreción de insulina debido a la degeneración de las células beta del páncreas, y 2) la diabetes mellitus tipo 2 (T2D), que se asocia a la generación de resistencia a la insulina o a una inadecuada secreción de esta (ADA, 2014). Según estimaciones, 422 millones de adultos alrededor del mundo presentaron diabetes en 2014, dando como resultado una prevalencia del 8.5%. Se estima que para 2030 habrá 552 millones de diabéticos a nivel mundial, con un incremento del 50% en su incidencia en los próximos 10 años (WHO, 2016).

2.1.1. Control hormonal de la homeostasis de glucosa

La homeostasis de glucosa en el cuerpo se regula estrechamente por la acción de la insulina. La insulina es una hormona polipeptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas como respuesta a niveles elevados de glucosa sanguínea. Además, 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 por la hormona insulina mantiene los niveles de glucosa en el plasma a una concentración basal de 5 mM, mediante la modulación del consumo y la captación de glucosa periférica, la síntesis de lípidos y la inhibición de la gluconeogénesis hepática (Ünal D 2012; Vogt MC *et al*, 2013).

A nivel molecular, la insulina cumple su acción a través de la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Para activar esta vía la hormona se une a la región extracelular de su receptor, produciendo así la autofosforilación de los residuos de tirosina de la región intracelular y la fosforilación, corriente abajo, de las proteínas IRS 1 y 2 (Sustrato del receptor de insulina 1 y 2). La activación de esta cascada de fosforilaciones induce la activación de la quinasa PI3K. La PI3K promueve la fosforilación y activación de las quinasas fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), la cual genera un segundo mensajero la fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) y la quinasa PDK1 que conllevan a la activación de proteína serina/treonina quinasa AKT/PKB, mediante la fosforilación de los residuos serina 473 y treonina 308. La quinasa AKT representa un dominio con actividad quinasa que una vez activa, induce la fosforilación de diversas proteínas diana, incluyendo reguladores directos de la supervivencia celular y factores de transcripción, cuyos eventos de señalización posteriores conllevan al aumento de la captación intracelular y metabolismo de la glucosa, disminuyendo su concentración en la sangre (Figura 1).

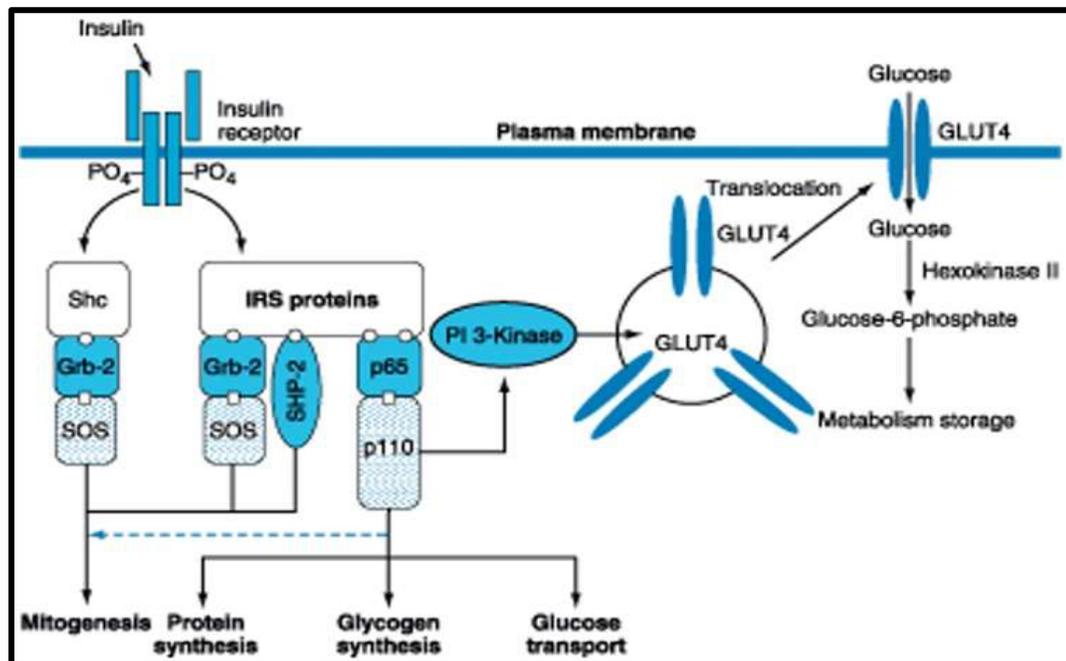


Figura 1. Homeostasis de glucosa mediada por insulina. (Riaz S, 2015)

2.1.2. El sistema nervioso regula la homeostasis de glucosa a través de la acción de la insulina

El sistema nervioso central (SNC) recibe múltiples señales del estatus energético del cuerpo y responde a ellas a través de la integración funcional de diversas estructuras cerebrales. El hipotálamo es una estructura predilecta en esta red, coordinando eventos específicos de regulación metabólica que integran tanto el gasto energético como la alimentación. El hipotálamo se encuentra localizado bajo el tálamo, abarca la mayor parte del diencefalo, y se divide en núcleo arqueado (ARC), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsolateral y núcleo paraventricular (PVH) (Figura 2A). El ARC se ubica adyacente a la base del tercer ventrículo en el hipotálamo mediobasal y está compuesto por dos grupos de neuronas; un grupo denominado orexígeno que expresa tanto al neuropéptido Y (NPY) y al péptido agouti (AgRP), que promueven la ingesta de alimento y reducen el gasto energético. Las neuronas del segundo grupo poseen efecto anorexígeno y son capaces de sintetizar la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) a partir del precursor de proopiomelanocortina (POMC) (Figura 2B). Muchas de las neuronas POMC también coexpresan el transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART) el cual, de igual manera, reduce la ingesta de alimento. Con ello, la acción conjunta de estas neuronas integra las señales periféricas de alimentación/nutrición y saciedad (Martínez MPB *et al*, 2010; Porte *et al*, 2005).

La relevancia de los núcleos del hipotálamo en el control de la homeostasis de energía ha sido caracterizada desde hace poco más de 10 años, siendo el ARC el que posee la expresión más abundante del receptor de insulina (Schwartz MW *et al*, 2013). En este contexto, la inyección de insulina en el tercer ventrículo del cerebro (intracerebroventricular, ICV), reduce la secreción de glucosa por parte del hígado (Obici S *et al*, 2003). Este hecho llevo a la hipótesis de que la vía de señalización de la insulina en el hipotálamo podría participar en el control de la glucosa periférica. Más tarde Pocai A y colaboradores en el año 2005, demostraron que la acción de la insulina promueve la apertura de canales de potasio disminuyendo la expresión hepática de la glucosa 6 fosfatasa y promoviendo la inhibición de la gluconeogénesis hepática. Investigaciones posteriores contribuyeron a demostrar que la insulina también regula la homeostasis de energía a través de la modulación de la ingesta de alimento, ya que su administración intrahipocampal disminuye la ingesta de alimento y reduce el peso corporal además de que sus efectos son revertidos al inhibir la señalización de

insulina (Coppola A. & Diano S., 2007). 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: 1) el control de la gluconeogénesis hepática y 2) la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal, todo esto a través de la activación neuronal del sistema de melanocortinas del ARC en hipotálamo que se describirá a continuación (Coppola, A. & Diano S., 2007; Vogt, M.C. & Bruning JC., 2013). La insulina actúa sobre las neuronas del ARC a través de la cascada de señalización IR-IRS-2, PI3K y PKB, a través de la apertura de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), del tipo SUR1/Kir6.2. La activación de estos canales fomenta la transmisión de la señal a través del nervio vago inhibiendo la expresión del gen de la glucosa 6 fosfatasa (G6Pase) en el hígado e impidiendo la gluconeogénesis (Pocai A *et al*, 2005; Lam CK *et al*, 2009). De esta manera el hipotálamo mantiene la homeostasis de glucosa corporal después de la ingesta de alimento.

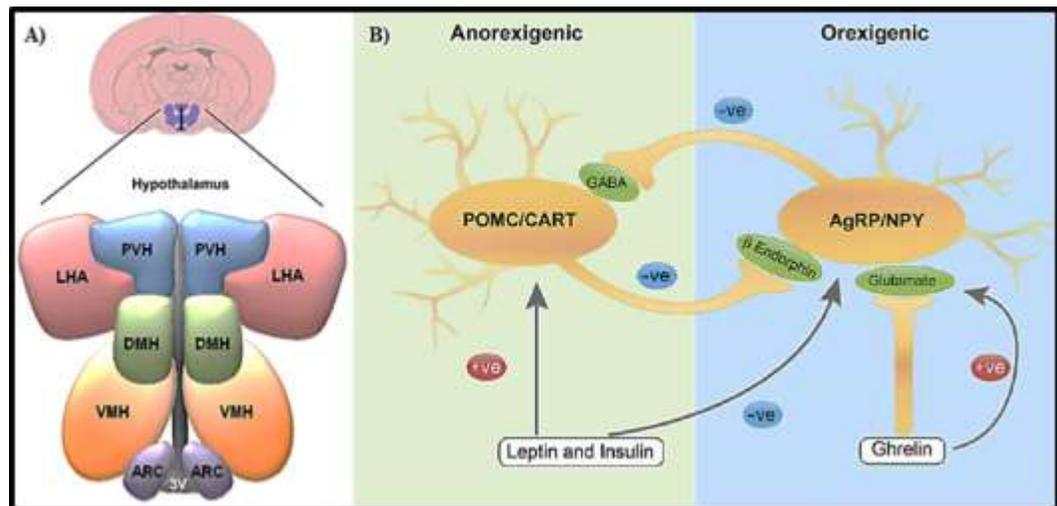


Figura 2. Núcleos hipotalámicos y regulación de la ingesta de comida por hormonas. (Ellacott KLJ & Cone RD, 2006; Williams LM, 2012).

2.1.3. Papel del sistema de melanocortinas y de grelina en la activación del sistema nervioso y la regulación de la ingesta de comida y saciedad

El sistema de melanocortinas tiene una función clave en diversos procesos endocrinos y homeostáticos, que incluyen pigmentación, esteroidogénesis, función sexual, analgesia, inflamación, homeostasis energética, entre otras. Este sistema está compuesto por la hormona estimulante de α , β y γ melanocitos (α MSH, β MSH y γ MSH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), una familia de cinco receptores de melanocortina acoplados a siete proteínas G transmembranales y dos antagonistas endógenos de melanocortinas, agouti y el AgRP (Ggantz I & Fong TM, 2003). Los principales actores del sistema de melanocortinas son los receptores MC3R y MC4R que son expresados en el ARC del hipotálamo. El primero tiene como ligandos a las hormonas α -MSH y γ -MSH e inhibe la función anorexigénica de las neuronas POMC. El MC4R, además de tener como ligando a la α -MSH, reconoce al péptido agouti, el cual tiene un efecto antagónico sobre estos receptores y resulta en hiperfagia, hiperinsulinemia, hipometabolismo y obesidad. Por su parte, las neuronas POMC del ARC también presentan receptores para la hormona leptina, la cual regula los niveles del mRNA de POMC y AgRP, alterando su producción en condiciones de balance energético alterado, como ayuno y lactancia (Ellacott KLJ & Cone RD, 2006). Cabe señalar que, las señales periféricas que regulan la ingesta de alimento no solo se limitan a la leptina, sino también participan la insulina y la grelina, de esta última se hablará con detalle más adelante. Tanto la leptina como la insulina ejercen su efecto sobre las neuronas orexígenas y anorexígenas del ARC, inhibiendo a las primeras por lo que se reduce la ingesta de alimento y activando a las neuronas que expresan neuropéptidos anorexígenos que inhiben la ingesta de alimento e incrementa el gasto energético (Khanh DV *et al*, 2014) (Figura 3).

Además del sistema de melanocortinas existe otro sistema encargado de la ingesta de alimento y la homeostasis energética, el sistema de grelina. La hormona grelina es un péptido de 28 aminoácidos producida por células endocrinas de la mucosa gástrica, que actúa a través del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) expresado en diversos tejidos como el hipotálamo, donde produce una potente señal orexigénica (Murakami N *et al*, 2002; Perello M & Zigman JM, 2012). Sus niveles en circulación se ven incrementados antes de la ingesta de alimentos y en periodos de privación de comida, y regresan a un estado basal después de consumir alimentos (Figura 3A) (Cummings *et al*,

2001; Callahan *et al*, 2004). Sus células blanco en el SNC son las neuronas POMC y NPY/AgRP del ARC y el PVH. Molecularmente, la grelina se une a la presinapsis de las neuronas NPY incrementando los niveles de mRNA de NPY y AgRP, disminuyendo así el gasto energético y promoviendo la ingesta de alimento (Asakawa A *et al*, 2001; Kamegai J *et al*, 2001). La activación de las neuronas NPY/AgRP incrementa la secreción de el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 3B), el cual inhibe a las neuronas POMC en la post-sinapsis causando así un bloqueo en su función anorexénica (Cowley MA *et al*, 2003; Ellacott KLJ & Cone RD, 2006).

De esta manera, la regulación de la ingesta de alimento se regula a nivel de los núcleos del hipotálamo por al menos tres hormonas específicas de órgano, la insulina de las células beta del páncreas, la leptina del tejido adiposo blanco y la grelina de las células endocrinas de la mucosa gástrica.

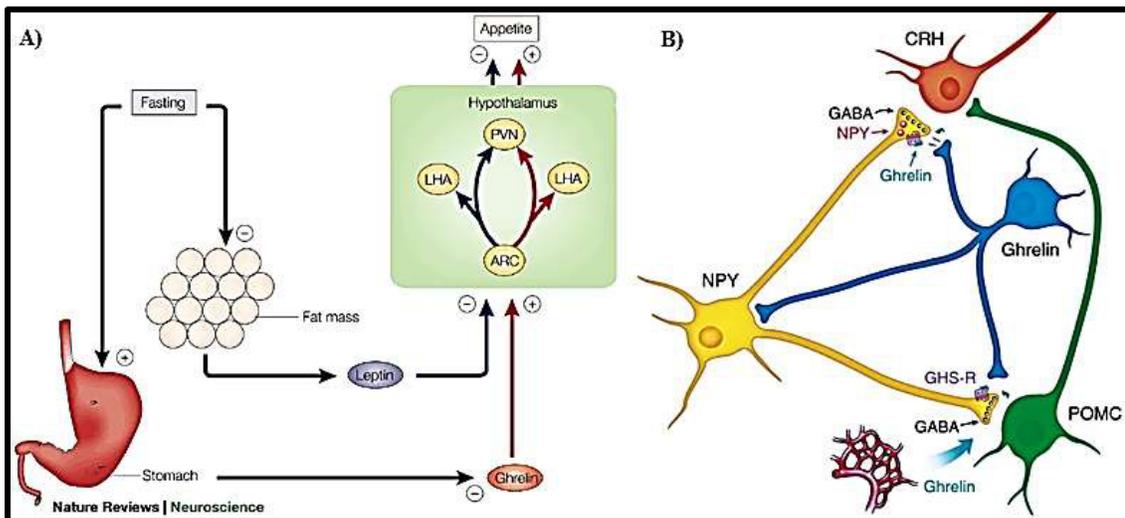


Figura 3. Regulación del apetito por la acción de grelina. A) Bloqueo de la producción de leptina por el tejido adiposo durante un periodo de ayuno, B) Regulación a nivel pre-sináptico de la acción de la grelina en los axones de neuronas hipotalámicas (Cowley MA *et al*, 2003; Ellacott KLJ & Cone RD, 2006).

2.1.4. La lipotoxicidad en el contexto de obesidad promueve el desarrollo de resistencia a la insulina y grelina

La obesidad es un factor de riesgo que incrementa la susceptibilidad a presentar trastornos metabólicos incluyendo hiperglicemia, hipertensión, resistencia a la insulina, T2D, aterosclerosis, hipertrigliceridemia, cáncer, hígado graso no alcohólico, síndrome de ovario poliquístico y otros más (Virtue S & Vidal-Puig A, 2008). A la fecha, el vínculo molecular entre la obesidad y la resistencia a la insulina no está del todo claro, sin embargo, se ha propuesto que el exceso de SFA libres en plasma puede desencadenar resistencia a la insulina, a través de un proceso conocido como lipotoxicidad. La lipotoxicidad se define como la acumulación y acción tóxica de diversas especies de lípidos en tejidos no adiposos como hígado, páncreas y el SNC. En estos órganos, debido a su limitada capacidad de almacenaje de triglicéridos (TG), su exceso promueve su conversión hacia acil-coenzima A (Acil-CoA) a una velocidad que supera la capacidad beta-oxidativa de la célula, lo que culmina con el exceso de SFA no oxidados que se metabolizan en especies tóxicas como ceramidas y diacilgliceroles, lo que induce respuestas tóxicas órgano específicas y promueve apoptosis (Shimabukuro M *et al*, 1998; Martínez MPB *et al*, 2010). Normalmente, los órganos no adiposos impiden este fenómeno gracias a la acción de la leptina, esta hormona incrementa los niveles de oxidación beta por encima de los requerimientos energéticos de las células al promover la expresión de genes de enzimas oxidativas, como la acil-CoA oxidasa (ACO) de los peroxisomas y la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) de la mitocondria (Unger RH Orci L, 2000). Sin embargo, durante periodos de hiperlipidemia crónica, esta capacidad se ve superada, en parte por la presencia de estrés del retículo endoplásmico, un proceso relacionado con la lipotoxicidad (Martínez MPB *et al*, 2010). Ya ha sido demostrado que la inducción farmacológica de estrés del retículo endoplásmico induce resistencia a la leptina (Hosoi T *et al*, 2008; Ozcan L *et al*, 2009), esto no solo implica un fallo en el mecanismo de protección celular contra la esteatosis, sino también promueve un fallo en la acción anorexigénica de la leptina, además de inducir resistencia a la insulina (Won JC *et al*, 2009), alterando la homeostasis energética de los individuos. Otro mecanismo involucrado con la presencia de lipotoxicidad y su efecto en la alteración del metabolismo es la inflamación. En este contexto, se ha identificado la activación de dos vías de señalización intracelulares pro-inflamatorias durante desordenes metabólicos, estas vías son c-Jun amino-terminal kinase (JNK) 1 y la vía (IKK β)/NF- κ B (Solinas G & Karin M, 2010). Es importante recalcar que

estas mismas vías pueden ser activadas no solo por microorganismos, sino también por estrés oxidativo, lípidos saturados y estrés del retículo endoplásmico (Williams LM, 2012).

Similar al efecto negativo de la obesidad sobre la sensibilidad a la insulina, un balance positivo de energía fomenta alteraciones en la sensibilidad a la grelina. Se conoce que la obesidad inducida por dieta alta en grasas (DIO) decrece el transporte de grelina al hipotálamo por cambios en la barrera hematoencefálica (Banks WA *et al*, 2008). Además, la administración de grelina exógena en un modelo de obesidad, es inactiva para promover la ingesta de alimento (Perreaut M *et al*, 2004). De igual forma, el desarrollo de obesidad en ratones por exposición a dieta alta en grasas por 12 semanas, promueve disminución de grelina plasmática, del mRNA de la enzima grelina O-aciltransferasa (GOAT) y de la expresión hipotalámica del receptor de grelina (GHSR) (Naznin F *et al*, 2015). Estos datos sugieren que la obesidad induce resistencia a la grelina.

2.2. La inflamación sistémica durante la obesidad promueve resistencia a la insulina

El término resistencia a la insulina (RI) fue utilizado en un principio para designar una condición en la cual pacientes diabéticos requerían la administración de dosis cada vez más altas de insulina, llegando a un máximo de 110 mg/dL para controlar su nivel de glucosa en sangre (Szablewski L, 2011). Esto significa que la falla en la regulación de la glicemia está dada por la pérdida de la capacidad que tiene la insulina para realizar sus funciones fisiológicas promoviendo un incremento en los niveles de glucosa en el plasma y el desarrollo de T2D (Himsworth HP & Kerr RB, 1939). Se propone que el incremento de lípidos durante la obesidad promueve la interacción de estos con los TLR's, produciendo así una forma atípica de inflamación (Wang Z *et al*, 2012; Milanski M *et al*, 2009).

La respuesta inflamatoria consta de un sistema celular innato y respuestas humorales que ocurren al presentarse alguna lesión (daño por frío o calor, isquemia, traumatismos, etc.). Según la duración y el tipo de células que participan en la respuesta inflamatoria se puede dividir en 2 tipos: la inflamación aguda, caracterizada por durar tan solo minutos u horas y por la abundante presencia de neutrófilos, y la respuesta inflamatoria crónica que puede durar días o años con una población de linfocitos predominante en el tejido inflamado. Para activar

la respuesta inflamatoria se requiere del reclutamiento de macrófagos y leucocitos, la activación de células endoteliales, agregación plaquetaria y la liberación de diversas citocinas incluyendo la IL-1 y el TNF- α . Es a través de estos eventos que el cuerpo restablece la homeostasis y defiende al organismo de lesiones externas (Charles N *et al*, 2010).

A pesar de su importancia para mantener la homeostasis, la liberación crónica de señales inflamatorias promueve el desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, hipertensión y desórdenes cardiovasculares. Los orígenes de estos factores de inflamación son variados, en algunos casos, el perfil genético puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades, en otras circunstancias, factores externos como la contaminación, estrés y alteraciones endócrinas funcionan como principales iniciadores de enfermedades relacionadas con inflamación (Purkayastha S & Cai D, 2013). En el contexto de obesidad se ha observado la presencia de inflamación sistémica, la cual, a diferencia de la inflamación clásica, no es inducida por infecciones o daños al tejido, sino por un exceso calórico. A este tipo de inflamación se le conoce como “metainflamación” o “inflamación metabólica” (Dongsheng C & Tiewen L, 2011). Se propone que la inflamación está presente en varios tejidos de importancia en la regulación metabólica incluyendo el hígado, el tejido adiposo y el músculo. A nivel molecular, se propone que los inductores de la metainflamación son los SFA que activan receptores membranales y promueven un fenotipo pro-inflamatorio. En específico, se ha demostrado que los lípidos saturados promueven inflamación mediante su interacción con los TLR1 y TLR4 activando al factor nuclear *kappa* B (NF- κ B), un promotor de genes inflamatorios (Calder PC, 2013; O'Neill LA & Hardie DG, 2013).

2.2.1. La inflamación del sistema nervioso modula el desarrollo de desórdenes metabólicos relacionados a la resistencia a la insulina y grelina

Amplia evidencia ha demostrado que la inflamación crónica durante la obesidad no se limita al tejido adiposo, sino que invade fronteras más lejanas y puede detectarse en el sistema nervioso central. Esta respuesta inflamatoria puede originarse por el reclutamiento de células periféricas del sistema inmune, principalmente macrófagos y células B hacia el SNC promoviendo la generación de inflamación (Buckman BL *et al*, 2014). Hace algunos años se reportó que, al inducir obesidad mediante dieta alta en grasa, en ratones, existía un reclutamiento de linfocitos B hacia el hipotálamo, lo cuales producen anticuerpos IgG

patogénicos que favorecen la producción de citocinas inflamatorias y la polarización de macrófagos hacia el fenotipo pro-inflamatorio M1, resultando en la generación de resistencia a insulina (Winer DA *et al*, 2011). De interés, en condiciones de obesidad, existe evidencia que las inmunoglobulinas (IgG1) producidas por los linfocitos B son capaces de activar a la microglía residente en el SNC, presumiblemente a través de los receptores Fc, proponiendo que el SNC posee un tipo celular que responde a señales inflamatorias y a su vez promueve inflamación (Yi CX *et al*, 2012).

La microglía son células del sistema inmune innato residentes del SNC, cuya activación se ha documentado en el desarrollo de inflamación en diversos desórdenes neuronales (Crain JM. *et al*, 2013). Fisiológicamente, la microglía tiene funciones versátiles, incluyendo su interacción con las sinapsis para modular la plasticidad sináptica y su actividad fagocítica durante la neurogénesis y apoptosis (Schafer DP *et al*, 2015; Wake H *et al*, 2011), sin embargo, bajo circunstancias patológicas dichos procesos pueden desencadenar alteraciones metabólicas. Se ha reportado que la ingesta crónica de dieta alta en grasa, disminuye la formación de memoria espacial dependiente del hipocampo, debido a la activación de un proceso de “poda” sináptica causado por la microglía (Hao S *et al*, 2015). Adicionalmente, en estudios recientes se demostró que la ingesta de dieta alta en grasas saturadas incrementa la expresión de citocinas inflamatorias en el hipotálamo sin evidencia de signos de inflamación periférica, presumiblemente regulada por la microglía (Valdearcos M *et al*, 2014; Maric T *et al*, 2014). De importancia, se sabe que son suficientes 3 días de exposición a una dieta alta en grasa para promover gliosis e inflamación en el hipotálamo de ratas y ratones aunado a inflamación, sin cambios aparentes en los órganos periféricos (Thaler JP *et al*, 2012). Aunque no se conoce con precisión los mecanismos moleculares de la activación de inflamación en el SNC dependiente de la microglía en el contexto de obesidad, se propone que bien pudiera estar asociado a la activación de la vía IKK/NF- κ B, la cual describiremos a continuación.

Desde hace unos años se conoce que los miembros de la familia IKK/NF- κ B se encuentran activos de forma constitutiva en el hipotálamo, y pueden también activarse por distintos factores como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), citocinas, quimiocinas, neurotransmisores, etc., que influyen en la modulación de procesos sinápticos, incluyendo neurotransmisión,

neuroprotección y la proliferación de células madre neuronales (Kaltschmidt B & Kaltschmidt C *et al*, 2009; Bhakar AL *et al*, 2002). Sin embargo, se conoce que la activación aberrante del eje IKK/NF- κ B ha sido relacionada con neuroinflamación selectiva y neurodegeneración independiente de apoptosis (Maqbool A *et al*, 2013). Por otra parte, diversas investigaciones han reportado que la activación de la vía IKK β /NF- κ B durante la obesidad, decrece la neurogénesis, incrementa el deterioro cognitivo y degeneración de células madre hipotalámicas (Bonifati & Kishore, 2007; Li, *et al*, 2012). Además, también se ha demostrado que la lipotoxicidad activa el eje pro-inflamatorio IKK β -NF- κ B en el hipotálamo, promoviendo la generación de resistencia a la insulina (Posey, *et al.*, 2009; Cai, 2013; Zhang, *et al*, 2008). El deterioro en la proliferación y la diferenciación neuronal, observado en ratones obesos, parece ser una consecuencia de la liberación excesiva de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β , que se produce tras la activación de NF- κ B y que también se sabe se activan eficientemente mediante retroalimentación positiva el eje IKK β /NF- κ B (Li, *et al.*, 2012; McNay, *et al.*, 2012). Dicho eje es un modulador de disfunciones metabólicas y de acuerdo con estas observaciones, de deterioro cognitivo. Contrariamente, la inhibición de la vía IKK β /NF- κ B con un terpenoide (Rb1) reduce la inflamación y resistencia a la leptina en el hipotálamo (Wu Y *et al*, 2014).

Aunque, no están del todo claros los mecanismos moleculares vinculados a la activación de inflamación en el SNC en condiciones de lipotoxicidad; se ha propuesto que los SFA son capaces de interactuar y ejercer la heterodimerización de los TLR1 y TLR2, la homodimerización de los TLR2 y TLR4 y movilización simultánea hacia la región de las balsas lipídicas, posiblemente por la interacción de los SFA con los dominios hidrofóbicos presentes en la región extracelular de los TLR's (Huang S *et al*, 2012). Lo anterior, puede promover la expresión de citocinas inflamatorias, a través de la activación de NF- κ B, y estrés del retículo endoplasmático en el hipotálamo de roedores (Milanski M *et al*, 2009) (Wang Z *et al*, 2012). Se sabe que la activación de esta vía interrumpe los mecanismos vinculados a la saciedad y el hambre, en parte a los señalados en el ARC coordinando señales orexigénicas y anorexigénicas (Milanski M *et al*, 2009) (Wang Z *et al*, 2012), (Reis WL *et al*, 2015).

Finalmente, también existe evidencia de que la activación de la inflamación asociada a la lipotoxicidad por inyección intracerebroventricular de ácido esteárico altera la secreción de insulina en el páncreas a través de la producción de TNF- α (Calegari VC *et al*, 2011),

influyendo en la homeostasis de glucosa sanguínea. En su conjunto, se propone que alteraciones en el control de los niveles de glucosa y la ingesta de comida, pueden estar vinculadas a la activación de la microglía en el SNC a través de la vía TLR-IKK β -NF- κ B. De manera similar, existe evidencia demostrando que la inflamación puede inducir resistencia a la acción homeostática de grelina. En trabajos realizados en 2015 por Naznin F y colaboradores observaron que la exposición de dieta alta en grasa a ratones durante 12 semanas, presentaron infiltración de macrófagos y microglía activa en el ARC, que correlacionaba con una elevada producción de citocinas inflamatorias y con el decremento orexigénico de grelina para fomentar la ingesta de alimento.

2.2.2. Papel de TANK-BINDING KINASE 1 (TBK1) en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2

Como parte de la vía TLR-IKK β -NF- κ B se encuentran proteínas adicionales entre las que destacan la proteína TBK1, miembro de la familia de las proteínas IKK's, que interviene en la respuesta inmune innata mediante la integración de múltiples señales inducidas por infecciones virales, modula al factor regulador del interferón 3 (IRF3) y se le ha relacionado con una variedad de enfermedades autoinmunes y cáncer (Xiaolei M *et al*, 2012). En específico, TBK1 activa al complejo NF- κ B mediante la activación directa de IKK β (Pomerantz JL & Baltimore D, 1999; Tojima Y *et al*, 2000). El primer reporte que demuestra la participación de esta proteína en la falla metabólica en el contexto de obesidad, fue demostrado por Muñoz *et al*. 2009, quienes reportaron que la TBK1 induce la fosforilación del residuo de serina 994 del receptor de insulina, lo que correlaciona con resistencia a la insulina *in vivo* e *in vitro* (Muñoz MC *et al*, 2009). Evidencia reciente señala que TBK1 puede ser un blanco farmacológico favorable, ya que la inhibición del binomio molecular TBK1/IKK ϵ previene la generación de T2D en ratones obesos (Reilly SM *et al*, 2013). En este contexto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la estimulación con lípidos saturados activa favorablemente a la TBK1, que se moviliza hacia la región de las balsas lipídicas en neuronas de hipotálamo de ratones obesos, lo cual correlaciona con resistencia a la insulina (Delint-Ramirez I *et al*. 2015). De interés, datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que TBK1 se activa a nivel de microglía y coinciden con la liberación de citocinas proinflamatorias tales como la TNF- α e IL-6. Nuestros datos correlacionan con

un estudio reciente mostrando que la inhibición intrahipotalámica de IKK ϵ decrece los niveles de TNF- α mejora la sensibilidad a la insulina y leptina y disminuye la ingesta de comida (Weissmann L *et al*, 2014).

Adicionalmente, el binomio molecular TBK1/IKK ϵ parece tener funciones mucho más versátiles vinculadas a la regulación de la homeostasis de la glucosa corporal. En un estudio reciente se demostró que la inhibición de TBK1/IKK ϵ en ratones obesos induce la liberación de IL-6 quien estimula la fosforilación de la vía STAT3 en el hígado suprimiendo la gluconeogénesis (Reilly SM *et al*, 2015).

En su conjunto, estas evidencias destacan la participación de la microglía como un tipo celular dentro del SNC con capacidad de producir citocinas durante el efecto lipotóxico generado por el incremento de lípidos durante la obesidad. Sin embargo, fisiológicamente hablando, la microglía tiene funciones mucho más versátiles en el SNC incluyendo su interacción con las sinapsis para modular la plasticidad sináptica y su actividad fagocítica durante la neurogénesis y apoptosis (Schafer DP *et al*, 2015; Wake H *et al*, 2011), que bien pudieran estar moduladas durante el efecto lipotóxico. Con todo lo anterior, concebimos que la obesidad promueve la activación de la vía pro-inflamatoria IKK ϵ /TBK1/NF- κ B en la microglía a nivel del hipotálamo, incrementando la susceptibilidad a desarrollar resistencia a la insulina y grelina asociados a la generación de diabetes tipo 2. Sin embargo, desconocemos, por un lado, cuáles son las especies de lípidos que activan la respuesta inflamatoria en células de la microglía y si esto es determinante para el deterioro metabólico.

3. JUSTIFICACIÓN

Con el aumento en la incidencia de obesidad en México se ha incrementado la susceptibilidad a enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, complicaciones cardiovasculares, apnea del sueño, hígado graso no alcohólico y síndrome de ovario poliquístico. Dada la importancia del efecto de la obesidad en la salud, es necesario esclarecer los mecanismos moleculares por los cuales el incremento de lípidos favorece el decremento en la sensibilidad a la insulina como un importante componente en el desarrollo de diabetes tipo 2. Este proyecto aportará información relevante para evaluar la importancia de la proteína TBK1 a nivel del sistema nervioso central como un potencial blanco farmacológico en la modulación de la resistencia a la insulina durante la obesidad y en las alteraciones metabólicas asociadas a la misma.

4. HIPÓTESIS

La activación de la TBK1 en la microglía del hipotálamo por lípidos saturados promueve la liberación de citocinas inflamatorias induciendo resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si la lipotoxicidad asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina promueve la activación de la proteína TBK1 en la microglía y la liberación de citocinas inflamatorias, y sí su función genera complicaciones metabólicas asociadas a la diabetes.

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de interleucinas secretadas por células de la microglía en cultivo estimuladas con lípidos saturados, insaturados y ceramidas.
- Determinar los niveles de proteína TBK1 en células de la microglía estimulada con lípidos saturados, insaturados y ceramidas.
- Identificar si la inyección intrahipotalámica de los lípidos más eficientes en promover la liberación de citocinas por células de la microglía genera resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Para realizar el cultivo primario de microglía se utilizaron ratas de 2 días de edad de la cepa Wistar, procedentes del bioterio del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, UANL.

Además, se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 270g y 290g para realizar la cirugía estereotáxica. Los animales se mantuvieron en ciclo de luz y oscuridad de 12 horas con 30g de alimento diario, en el bioterio del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, UANL. El presente trabajo con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL y Hospital Universitario “José Eleuterio González” con la clave BI12-001

6.1.2 Materiales y reactivos

- Anti-NAK anticuerpo (abcam, ab40676, Massachusetts, USA)
- Anti-fosfo NAK serina 172 (abcam, ab109272, Massachusetts, USA)
- Kit de detección de la vía de señalización NF- κ B (Cell Signaling, 9936S, Massachusetts, USA)
- β -Actin (D6A8) conejo monoclonal Ac (Cell Signaling, 8457P, Massachusetts, USA)
- Anti-ratón IgG, Anticuerpo unido a HRP (Cell Signaling, 7076S, Massachusetts, USA)
- Anti conejo IgG-HRP bovino (Cell Signaling, sc-2370, Massachusetts, USA)
- TNF- α de rata ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, 88-7340, Massachusetts, USA)
- IL-6 de rata ELISA kit (Sigma-Aldrich RAB0311, Misuri, USA)
- IL-1 β de rata ELISA kit (Sigma-Aldrich RAB0277, Misuri, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (Sigma-Aldrich D5648, Misuri, USA)
- Medio Leibovitz's L-15 (Sigma-Aldrich L4386, Misuri, USA)
- Suero fetal bovino (PAA Laboratories, PAA A15-751, Ontario, Canadá)
- Albúmina sérica bovina (Santa Cruz Biotechnology, sc-2323, Texas, USA)
- Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos por choque térmico (Equitech-Bio BAH66-0100)

- Ácido palmítico (Sigma-Aldrich CAS 57-10-3, San Luis, Misuri)
- Ácido palmitoleico (Sigma-Aldrich P9417, San Luis, Misuri)
- Ácido linoleico (Sigma-Aldrich L1376, San Luis, Misuri)
- Ácido esteárico (Sigma-Aldrich S47S1, San Luis, Misuri)
- N-hexanoil-D-esfingosina (Sigma-Aldrich H6524, San Luis, Misuri)
- LPS *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma-Aldrich L2630, San Luis, Misuri)

6.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.2.1. Cultivo celular de microglía

6.2.1.1. Cultivo primario

- Se extrajeron los cerebros de ratas de 2 días de edad (P2), a los cuales se les removió la corteza cerebral y fue depositada en una placa de Petri que contenía 10 mL del medio Leibovitz's (L-15) a 4°C. Se removieron las meninges y se colocaron en tubos conicos de 50 mL con 1 mL de medio L-15 a 4°C, por cada 2 cerebros procesados. El tubo fue centrifugado a 2,500g por 5 min a 4°C. Al terminar la centrifugacion se reemplazo el medio por L-15 nuevo en el cual se disgrego el tejido por pipeteo, 10 pipeteos con una pipeta de 10 mL, seguido por otros 10 pipeteos con una pipeta de 2 mL.
- Se centrifugó a 2,500g por 5 min a 4°C y se reemplazo el medio L-15 con medio de cultivo DMEM completo (20% SFB y GM-CSF 20 nM), 1 mL por cada 2 cerebros procesados, resuspendiendo el precipitado mediante pipeteo.
- Se sembró 1 mL del mix de células obtenido en el paso anterior en botellas para cultivo de 75 cm² que contenía 11 mL de medio DMEM completo.
- Las botellas se mantuvieron en cultivo por 7 días a 37°C con 5% de CO₂, el medio se reemplazaba cada 3 días.
- A los 7 días de cultivo, el medio de cultivo se reemplazó y se procedió a cosechar la microglía en una incubadora con agitación constante a 200 rpm

por 1 h a 37°C. Inmediatamente después se recuperó el medio de cultivo de todas las botellas y se depositó en un tubo cónico de 50 mL donde se centrifugó a 2,500g por 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM (20% SFB).

- Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y se sembraron a una concentración de 2×10^5 células/mL en placas de 12 pozos. Las células se dejaron incubando por 24 h para que se adhirieran a las placas. Al cabo de este tiempo se procedieron a realizar los estímulos con los lípidos saturados, insaturados y ceramida, como se indica más adelante.

6.2.2. Preparación de las soluciones empleadas en los tratamientos

Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (ASB_{LAG})

- Se diluyeron 5 g de albúmina en 50 mL de medio DMEM sin ASB. Concentración final de ASB_{LAG} del 10%.

Ácido palmítico

- Se diluyeron 0.00256 g de ácido palmítico en polvo en 1 mL de etanol grado molecular filtrado (concentración final 10 Mm).
- De esta dilución se tomaron 100 µL y se agregaron a 900 µL de ASB_{LAG} al 10% (concentración final 1 mM). Finalmente, se agregaron 150 µL de esta última dilución a cada pozo de una placa de 12 pozos con 1.350 µL de medio. La concentración final fue de 100 µM.

Ácido esteárico

- Se diluyeron 0.00284 g de ácido esteárico en 1 mL de etanol grado molecular filtrado (concentración final de 10 mM).
- De esta dilución se tomaron 100 µL y se agregaron a 900 µL de BSA_{FFA} al 10% (concentración final 1 mM). Finalmente, se agregaron 150 µL de esta última dilución a cada pozo de una placa de 12 pozos con 1.350 µL de medio. La concentración final fue de 100 µM.

Ceramida C6

- Fueron pesados 0.00103 g de la ceramida y se diluyeron en 1.036 mL de etanol grado molecular filtrado (concentración 2.5 mM).

- De esta dilución se tomaron 100 μL y agregaron a 900 μL de ASB_{LAG} al 10%, la concentración de esta dilución será de 0.25 mM.
- Finalmente, se agregaron 150 μL de la última dilución a cada pozo de una caja de 12 que contenga 1.350 μL de medio de cultivo (concentración final de 25 μM).

Ácido palmitoleico

- Se diluyeron 0.00284 mL del stock de ácido palmitoleico en 1 mL de ASB_{LAG} al 10%, se obtendrá una (concentración final de 10 mM).
- De esta dilución se tomaron 100 μL y se agregaron a 900 μL de BSA_{FFA} al 10% (concentración final 1 mM). Finalmente, se agregaron 150 μL de esta última dilución a cada pozo de una placa de 12 pozos con 1.350 μL de medio. La concentración final fue de 100 μM .

Ácido linoleico (LIN)

- Tomar 0.0032 mL del stock de ácido linoleico y diluirlos en 1 mL de ASB_{LAG} (concentración final de 10 mM).
- De esta dilución se tomaron 100 μL y se agregaron a 900 μL de ASB_{LAG} al 10% (concentración final 1 mM). Finalmente, se agregaron 150 μL de esta última dilución a cada pozo de una placa de 12 pozos con 1.350 μL de medio. La concentración final fue de 100 μM .

Lipopolisacárido (LPS)

- De la solución concentrada de LPS se tomaron 3 μL del stock y diluirlos en 27 μL de agua miliQ estéril, se tendrá una dilución a 25 $\mu\text{g/mL}$.
- Finalmente, agregamos 150 μL de la dilución anterior en un pozo de una caja de 12 que contenía 1.350 μL de medio de cultivo (concentración final 0.1 $\mu\text{g/mL}$).

Fluido cerebro espinal artificial (FCEA)

- Se tomaron 7.35 mL de NaCl 1M, 2.2 mL de CaCl_2 0.05M y 0.066 mL de KCl 3M, posteriormente se aforo a 50mL para preparar el ACSF. La solución fue ajustada a pH 7.2.

6.2.3. Cuantificación de las citocinas liberadas

Las cuantificaciones se realizaron mediante la técnica de ELISA. Para la detección de IL-1 β e IL-6 se empleó el siguiente procedimiento:

- En una placa de 96 pozos se adicionaron 100 μ L de los estándares en orden ascendente, así como 100 μ L del medio de cultivo de células de la microglía estimulada con los distintos lípidos. Se dejó incubando a 4°C toda la noche en agitación.
- Después de esto desechamos el contenido de la placa y realizamos 4 lavados con 300 μ L de la solución de lavado incluida en el kit. Al finalizar el último lavado se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección biotinilado a cada pozo, se dejó incubando por 1h a temperatura ambiente.
- El anticuerpo se desechó después del periodo de incubación y nuevamente realizamos 4 lavados con 300 μ L de la solución de lavado incluida en el kit
- Se adicionaron 100 μ L del reactivo colorimétrico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pozo. Incubamos la placa por 30 min a temperatura ambiente agitándose en oscuridad.
- Posterior al tiempo de incubación se agregaron 50 μ L de la solución de paro a cada pozo. Inmediatamente después se procedió a leer la placa a una longitud de 450 nm.

Para la detección del TNF- α se siguió el siguiente procedimiento:

- Se cubrió la placa de 96 pozos Corning costar 9010, incluida en el kit, con 100 μ L del anticuerpo de captura. La placa fue sellada e incubada toda la noche a 4°C.
- Después de la incubación retiramos el excedente de anticuerpo y se realizaron 3 lavados con 250 μ L del buffer de lavado a cada pozo. Se secó la placa en papel absorbente luego del último lavado.
- Se adicionaron 200 μ L de la solución de bloqueo 1X ELISA/ELISPOT a cada pozo y se dejó incubar por 1h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con 250 μ L del buffer de lavado a cada pozo.

- Empleando la solución 1X ELISA/ELISPOT, diluimos los estándares según las instrucciones del kit. Luego de la dilución se adicionaron 100 μ L de cada estándar a los pozos en orden creciente por duplicado. De igual manera, se adicionaron 100 μ L de las muestras a cada pozo. Incubamos la placa toda la noche a 4°C.
- Después de la incubación retiramos el excedente de muestra y se realizaron 3 lavados con 250 μ L del buffer de lavado a cada pozo. Se secó la placa en papel absorbente luego del último lavado.
- Se adicionaron 100 μ L del anticuerpo de detección y después de sellar la placa se dejó incubando por 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente se hicieron 3 lavados con 250 μ L del buffer de lavado.
- Pasado el tiempo de la incubación, se procedió a agregar 100 μ L del reactivo Avidin-HRP a cada pozo. Se selló la placa y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
- Luego de los 30 min se realizaron los últimos 6 lavados con 250 μ L del buffer de lavado, entre cada lavado dejamos el buffer en la placa por 1min antes de retirarlo.
- Posteriormente adicionamos 100 μ L del reactivo colorimétrico TMB a cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 15min.
- Finalmente, se agregaron 50 μ L de la solución de paro a cada pozo y se procedió a leer la placa a 450 nm y 570 nm, se le restaron los valores de 570 nm a los de 450 nm.

6.2.4. Determinación de la activación de la vía NF- κ B y TBK en células de la microglía

Para la realización de estos experimentos se empleó cultivo primario de células de la microglía.

6.2.4.1. Cultivo primario

- Posterior a las 24h de sembrar las células de la microglía, se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Adicionamos 150 μL de la solución madre de cada uno de los tratamientos a las cajas de 12 pozos. Concentración final de ácidos grasos saturados e insaturados de 100 Mm , en el caso de la ceramida, la concentración final fue de 25 mM y la concentración del LPS fue de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- El periodo de incubación fue de 24 h a 37°C .
- Se lavó 2 veces con 2 ml de PBS a 4°C .
- Inmediatamente se agregaron 75 μL de buffer de lisis a cada una de las placas y fueron sonicadas a 20% de amplitud con 3 pulsos/segundo (30 veces).
- Se incubó a 4°C / 30 min resuspender con el vortex.
- Se llevó a cabo una centrifugación a 1,500g por 10 min a 4°C . Recuperar el sobrenadante.
- Se prepararon las muestras para el western blot.

6.2.4.3. Western blot

- Después de preparar las muestras para carga en los geles, se cargaron 30 μg de proteína por carril en geles de poli-acrilamida al 8%. Las proteínas se separaron por electroforesis primero a 95 mV por 15 min y, posteriormente a 130 mV por 1h.
- Habiendo terminado la electroforesis se procedió a la transferencia hacia una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 25 mV por 12h a 4°C . Una vez terminada la transferencia, se procedió a bloquear las membranas con albúmina sérica bovina al 5% por 1h en agitación.

Posterior al bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente (Anti-TBK1, p-TBK1, NF- κB o p-NF- κB) todos a una concentración de 1: 1,000, se incubó por 12h a 4°C en agitación constante.

- Posterior a la incubación con el anticuerpo primario se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente por 2.5 h a temperatura ambiente. Finalmente, se reveló la membrana en un transiluminador ChemiDoc XRS+ Bio-Rad.

- Las señales obtenidas mediante el Western Blot fueron cuantificadas empleando un programa de procesamiento de imagen digital desarrollado en el National Institute of Health, “Image J”.

6.2.5. Cirugía estereotáxica

Para realizar las cirugías se emplearon ratas de la cepa Wistar de un peso entre 260g y 280g.

- El animal fue sedado con ketamina 10 mg/kg + xilacina 2 mg/kg vía intraperitoneal. Se esterilizó la zona de la cabeza empleando yodo, posteriormente se procedió a realizar una incisión en la piel empleando bisturí a partir del punto de referencia lambda y hasta los ojos de la rata.
- Empleando un estereoscopio se ubicó el punto de referencia bregma y con referencia al atlas de Paxinos y Watson, se identificaron las coordenadas del tercer ventrículo (Ap: -2.56 mm, Lat: 0 mm y DV: -9.8 mm).
- Una vez localizadas las coordenadas se realizó un trépano, en el área correspondiente al tercer ventrículo, hasta llegar a la duramadre. Se lubricó el cráneo con vaselina con la finalidad de impedir el calentamiento excesivo del hueso.
- Aproximadamente a 5 mm del trepano se aseguró un tornillo de anclaje. Luego de asegurar el tornillo de anclaje se implantó la cánula. posteriormente tanto el tornillo como la cánula se aseguraron en su sitio recubriéndolos con acrílico dental.
- Finalmente, se suturó a la rata con aguja e hilo de cirugía, colocándolas en jaulas individuales, con un periodo de recuperación de 7 días antes de realizar las inyecciones.

6.2.5.1. Inyección intracerebroventricular

Una vez pasado el periodo de recuperación se realizaron las administraciones como se describe a continuación:

- Los lípidos fueron inyectados a través de la cánula a un flujo de 2 μ L/min.

- Las ratas fueron divididas en 4 grupos a los cuales se les administraron 2 μ L de la solución control (ACSF), ácido palmítico (32.4 mM) o LPS (0.1 μ g/mL).
- Se les aplicó una inyección diaria por 5 días. A todos los animales se les colocaron 60g de alimento diario, con la finalidad de determinar el porcentaje de consumo diario.

6.2.6. Curva de tolerancia a la insulina (ITT) y curva de tolerancia a la glucosa (GTT)

Todas las determinaciones de glucosa en sangre se realizarán empleando el Glucómetro ACCU-CHEK Performa a la misma hora del día (10:00 -12:00 am).

6.2.6.1. Curva de tolerancia a la insulina

La curva de tolerancia a la insulina se realizó el día posterior a la última inyección intracerebroventricular de lípidos.

- Los animales fueron sometidos a un ayuno de 4h antes de realizar la prueba.
- Luego del periodo de ayuno se cuantificó la concentración de glucosa basal en sangre, este será el tiempo cero.
- Posteriormente se administró 1U/Kg de insulina vía intraperitoneal a los animales y se determinó la concentración de glucosa a los 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección.

6.2.6.2. Curva de tolerancia a la glucosa

Antes de realizar la curva de tolerancia a la glucosa se dejó pasar una semana luego de la curva de tolerancia a la insulina.

- Se dejaron a los animales en ayuno nocturno por 12h. Al cabo de este tiempo se determinaron los valores basales de glucosa en sangre.
- Administramos 2g/Kg de glucosa vía intraperitoneal y se determinó la concentración de glucosa a los 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la inyección.

6.2.7. Pruebas de sensibilidad a la grelina

Se dejó pasar un día después de realizar la curva de tolerancia a la insulina antes de hacer esta prueba.

- Se inyectaron 2 μ L de grelina a una concentración de 1mg/mL a un flujo de 2 μ L/min en el tercer ventrículo a través de la cánula previamente implantada.
- Inmediatamente después de la inyección se alojaron a los animales en jaulas separadas y se les colocaron 30g de alimento a cada uno.
- Se determinó el consumo de alimento en gramos por cada animal después de las 4h de la inyección de la grelina.

6.2.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico primero se realizó una prueba de normalidad para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal, luego se procedió a realizar una tabla de ANOVA, finalmente se llevó a cabo una prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Capacidad inductora de la secreción de citocinas por ácidos grasos saturados, insaturados y ceramida en cultivo primario de células de la microglía

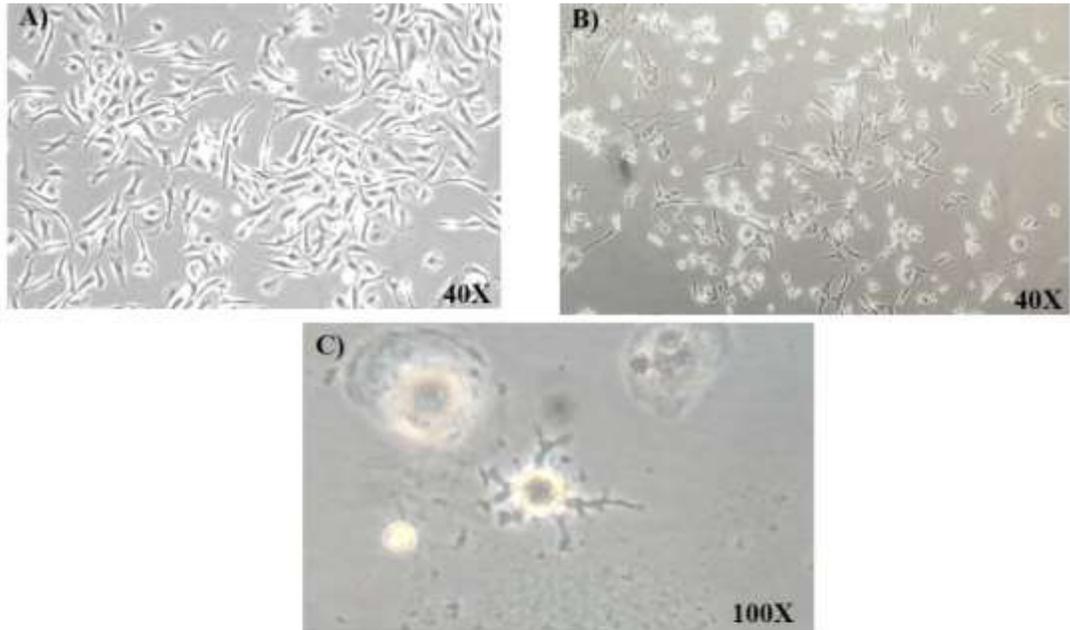


Figura 4. Cultivo primario de microglía. A) Imagen de referencia (Valdearcos M. et al, 2014) B) Cultivo primario enriquecido con 20% de SFB y 20 nM de GM-CSF. C) Fotografía del cultivo primario 100X.

La primera parte del presente proyecto consistió en la estandarización del cultivo primario. Como se puede apreciar en la figura 5, la morfología de nuestros cultivos primarios de células de microglía es concordante con la morfología de cultivos primarios de referencia (Valdearcos M et al, 2014). Una vez obtenidas las células, se procedió a realizar estimulación con $100\mu\text{M}$ de los distintos lípidos y $25\mu\text{M}$ de la ceramida C6 por 24h, y tal como se muestra en la figura 6, el ácido palmítico induce una secreción de $\text{TNF-}\alpha$ del 400% comparado con el control y del 200% comparado con los ácidos grasos insaturados; ácido palmitoleico y ácido linoleico, así como la ceramida de seis carbonos.

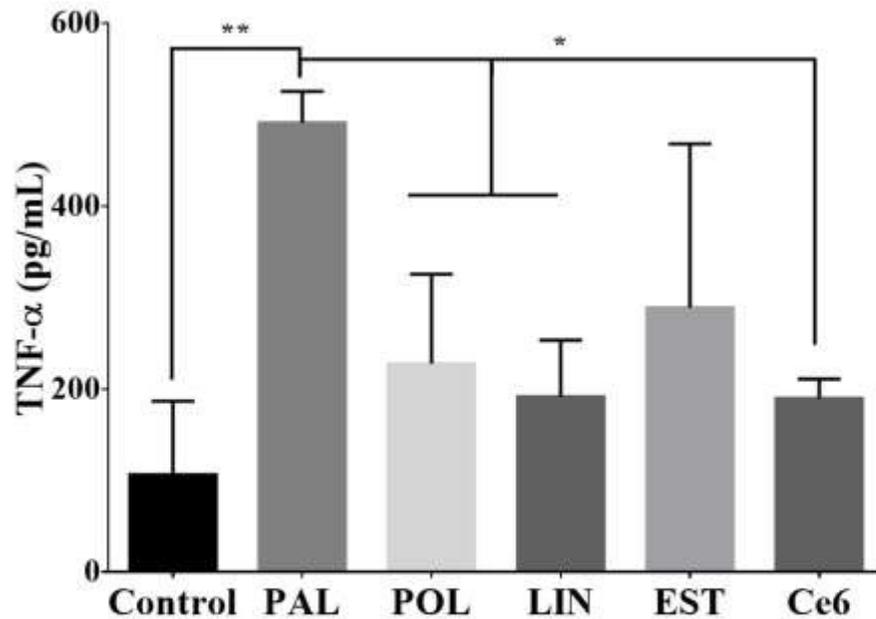


Figura 5. Secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por cultivo primario de células de la microglía estimulada con 1% de ASB_{LAG}; 100 μ M de ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido linoleico y ácido esteárico; 25 μ M de ceramida C6 por 24h (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las gráficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; *p<0.05, **p<0.01).

En cuanto a la interleucina 6 (IL-6) el ácido palmítico indujo una secreción 1.5 veces mayor a la observada en el grupo control, mientras que fue 6 veces mayor a la observada en el grupo tratado con la ceramdia C6 (Figura. 7).

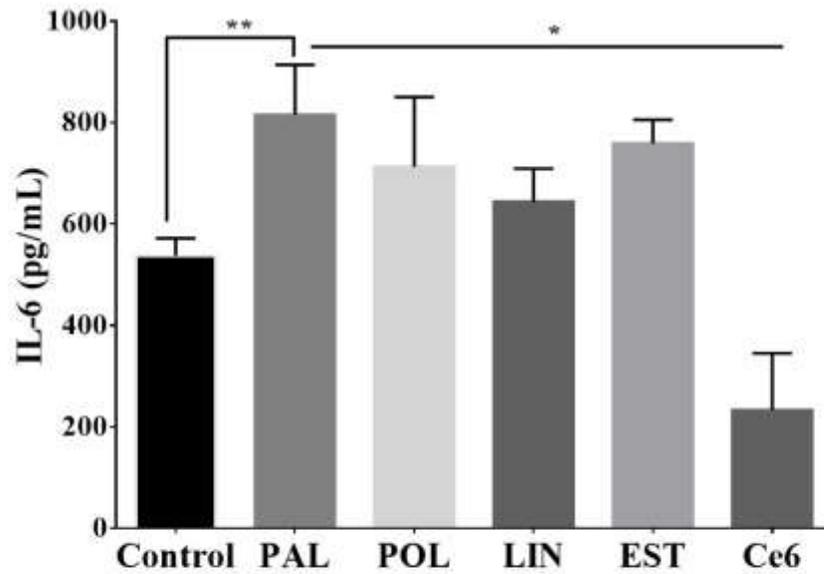


Figura 6. Secreción de la interleucina 6 (IL-6) por cultivo primario de células de la microglía estimulada con 1% de ASB_{LAG}: 100µM de ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido linoleico y ácido esteárico; 25µM de ceramida C6 por 24h (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las gráficas muestran datos normalizados de la media ± DE; *p<0.05, **p<0.01).

Finalmente, en la figura 8 se puede apreciar nuevamente que el ácido palmítico representa el principal inductor de secreción de la interleucina 1β (IL-1β) incrementando su producción 1.5 veces en comparación con el control y el ácido palmitoleico. Ningún otro lípido probado indujo la secreción de citocinas de forma significativa.

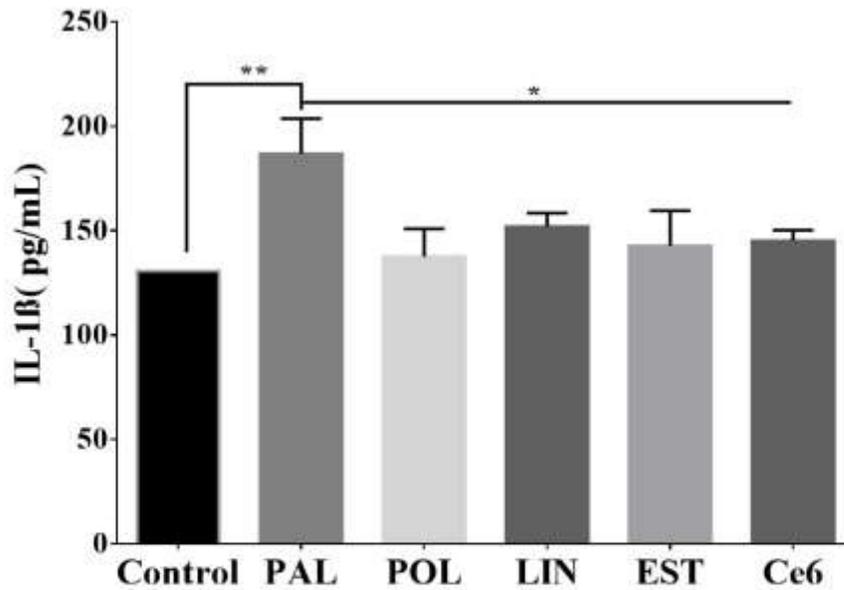


Figura 7. Secreción de la interleucina 1 β (IL-1 β) por cultivo primario de células de la microglía estimulada con 1% de ASB_{LAG}; 100 μ M de ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido linoleico y ácido esteárico; 25 μ M de ceramida C6 por 24h (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las gráficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; *p<0.05, **p<0.01).

Activación de TBK1 en cultivo primario de células de la microglía expuestos a ácidos grasos

Al analizar las células estimuladas con los diversos lípidos mediante *Western Blot*, se pudo apreciar un incremento en la fosforilación de la proteína TBK1 en los grupos tratados con LPS y ácido palmitoleico (Figura 8A), no así en el resto de los SFA probados (Figura 8).

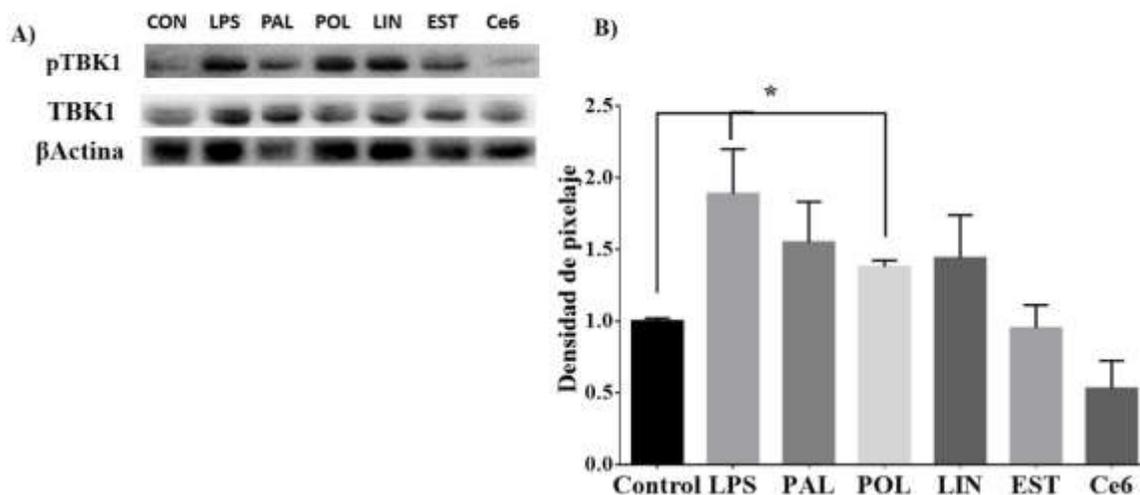


Figura 8. Inmuno blot del cultivo primario de microglia estimulada con 1% de ASB_{LAG} ; 100 μ M de ácido palmítico, ácido palmítoleico, ácido linoleico y ácido esteárico; 25 μ M de ceramida C6 por 24h. A) Proporción de cambio en la fosforilación de TBK1. B) Fosforilación de TBK1. (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las gráficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; * $p < 0.05$).

Alteraciones metabólicas inducidas por una inyección intracerebroventricular (ICV) de ácido palmítico en el tercer ventrículo

Una vez identificado el lípido más eficiente para inducir la secreción de citocinas inflamatorias, se procedió a con su administración a ratas Wistar mediante inyección ICV en el tercer ventrículo, con la finalidad de identificar si dicha manipulación regulaba los niveles de glucosa en el plasma y/o la ingesta de alimento. Previamente, se determinó el sitio exacto para implantación de la cánula de inyección ICV con base en el atlas de Paxinos y Watson (1985); el sitio corresponde al tercer ventrículo localizado justo al lado del ARC en las coordenadas Anteroposterior: -2.56, lateral: 0, dorso ventral: -8.9 (Figura 9).

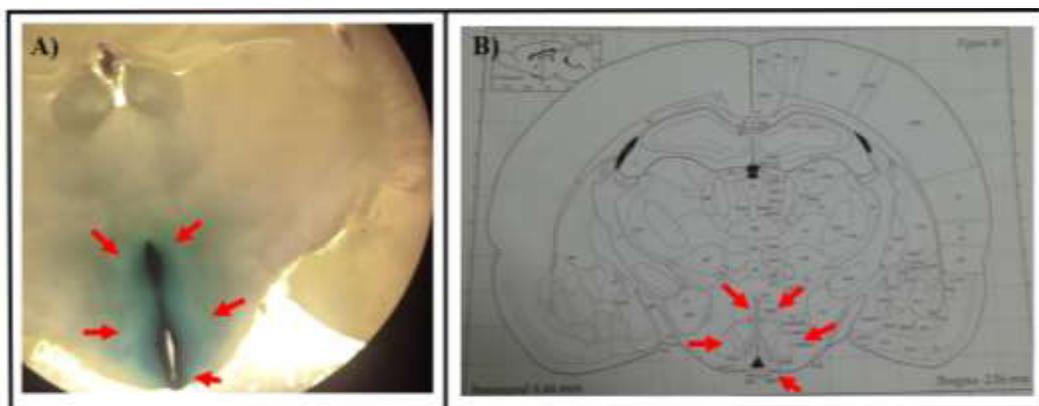


Figura 9. Corte coronal del cerebro de rata Wistar. A) Corte coronal de cerebro perfundido con azul de metileno. B) Imagen de referencia (Paxinos & Watson, 1985).

Una vez localizado el sitio de implantación, se procedió a realizar las administraciones con ácido palmítico por 5 días y se realizaron curvas de tolerancia a la insulina (Figura 10) y a glucosa (Figura 11).

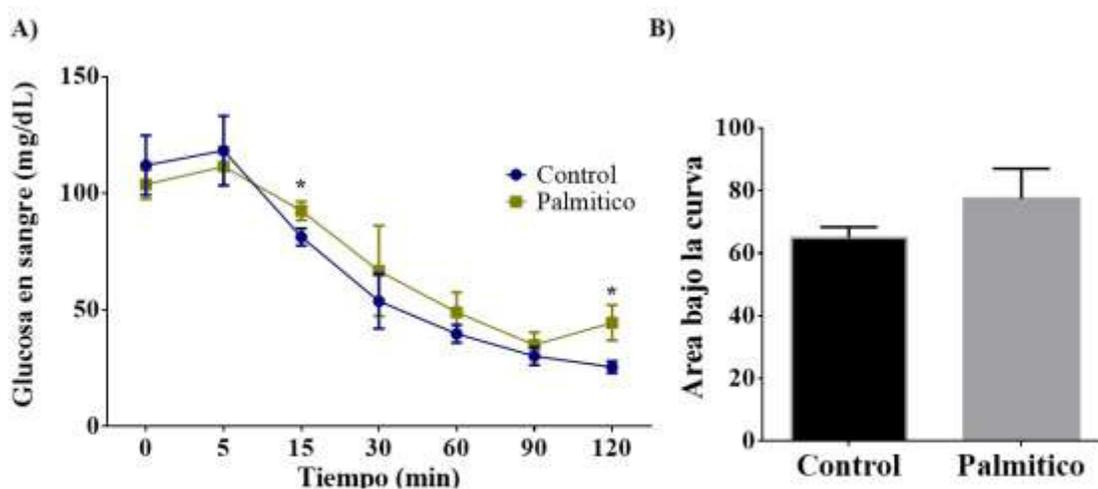


Figura 10. A) Curva de tolerancia a la insulina. B) Área bajo la curva del ITT. (n=4; las graficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; prueba t de student; * $p > 0.05$).

Los resultados demuestran que a pesar de verse un incremento en la concentración de glucosa en sangre a los 15 y 90 min en animales administrados con ácido palmítico en comparación al control en los ensayos de tolerancia a la insulina (Figura 10A), este cambio no representa una alteración global significativa en la concentración de glucosa (Figura 10B). De manera similar, no se observaron cambios significativos en la concentración de glucosa en sangre en ningún punto del tiempo (Figura 11A), así como a nivel global (Figura 11B), esto en los ensayos de tolerancia a la glucosa.

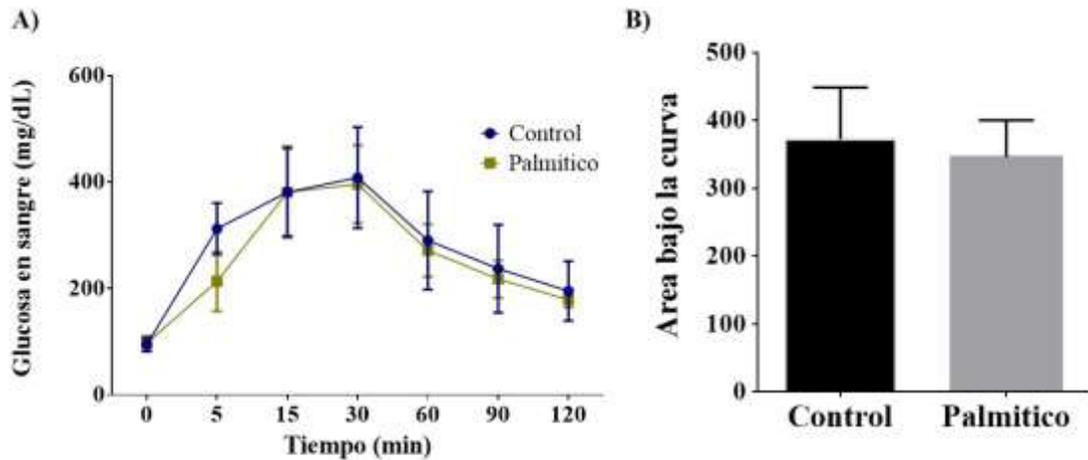


Figura 11. A) Curva de tolerancia a la glucosa. B) Área bajo la curva del GTT. (n=4; las graficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; prueba t de student; * $p > 0.05$).

Si bien no se observaron alteraciones en la homeostasis de la glucosa si observamos que los animales presentan incremento en el consumo de alimento (Figura 12A). Este efecto quedo demostrado luego de una administración ICV de grelina. En este protocolo se administró la grelina y se observó la ingesta de alimento durante 4 horas. Los resultados indican que los animales administrados con ácido palmítico consumen 3.5 veces más alimento que el grupo control. Similarmente, los animales administrados por LPS consumieron 5 veces más alimento que el control. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos administrados con ácido palmítico y LPS (Figura 12B).

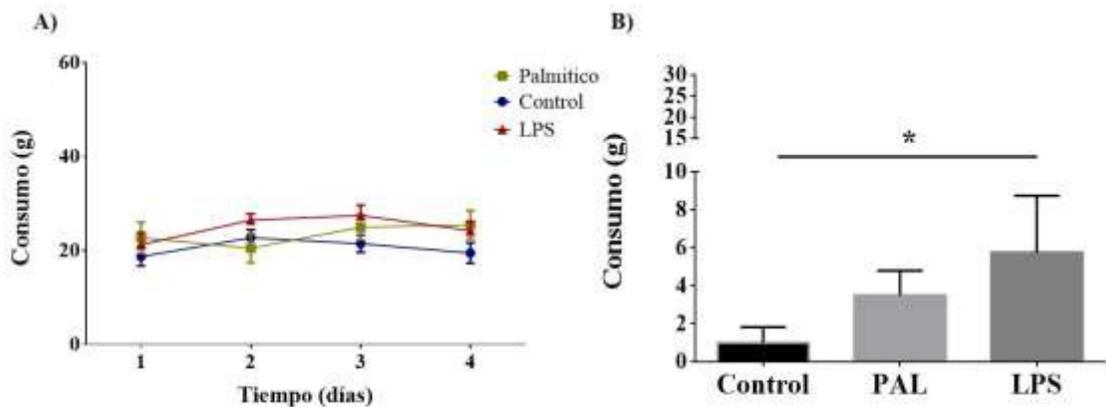


Figura 12. A) Consumo diario de alimento durante la administración de ácido palmítico, LPS y FCEA por 4 días. B) Alimento consumido luego de 4 horas posteriores a una administración con 1 μ g/mL grelina. (n=4; las graficas muestran datos normalizados de la media \pm DE; * $p > 0.05$).

Con la finalidad de identificar si existía alguna relación entre el incremento en la ingesta de alimento y el componente inflamatorio dado por el LPS y el ácido palmítico, se procedió a determinar si existía alguna alteración en la vía de activación de TBK1 y NF- κ B. Tal como se puede apreciar en la figura 13, luego de un estímulo con LPS por 4 días, se observó una disminución significativa del 75% en la fosforilación de la proteína TBK1 en comparación al control (Figura 13B); por su parte, estímulos con ácido palmítico si bien redujeron en un 50% (Figura 13B) la fosforilación de nuestra proteína de interés, en comparación al control, este cambio no fue estadísticamente significativo.

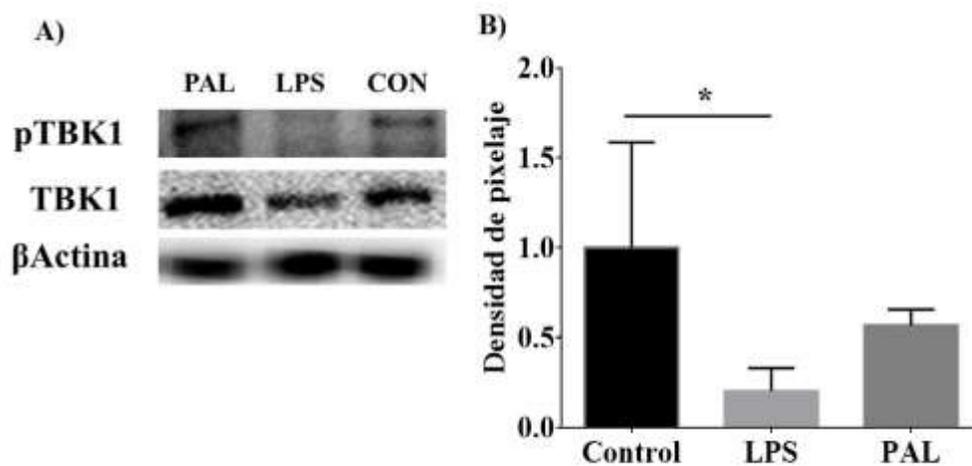


Figura 13. Inmuno blot del núcleo arqueado de ratas Wistar administradas con FCEA, LPS, o ácido palmítico por 4 días. A) Proporción de cambio en la fosforilación de TBK1. B) Fosforilación de TBK1. (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las graficas muestran datos normalizados de la media + SE; *p<0.05. (n=4; las graficas muestran datos normalizados de la media ± SE; *p> 0.05).

Finalmente se evaluó la inducción de inflamación en el ARC del hipotálamo mediante la fosforilación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 14A). Al realizar las pruebas pertinentes pudimos corroborar que, la administración de LPS induce la fosforilación de NF- κ B (Figura 14B) mostrando un índice de fosforilación 4 veces mayor respecto al control; el ácido palmítico, por su parte, si bien induce un cierto grado de fosforilación, este no es estadísticamente significativo.

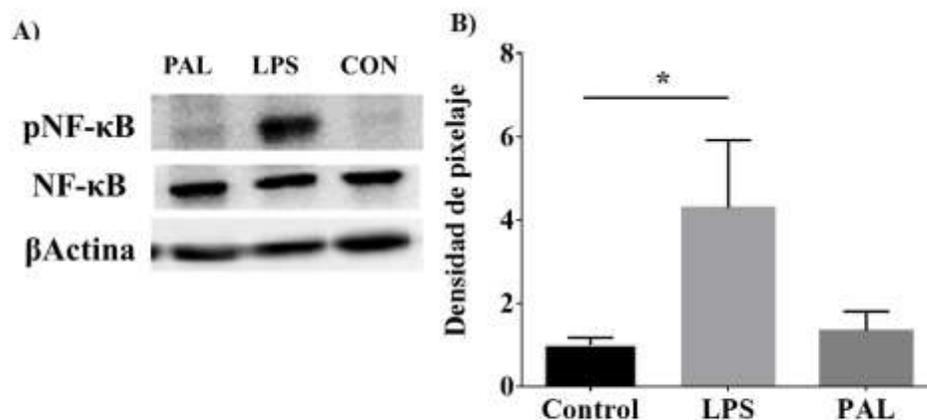


Figura 14. Inmuno blot del núcleo arqueado de ratas Wistar administradas con FCEA, LPS, o ácido palmítico por 4 días. A) Proporción de cambio en la fosforilación de NF-κB. B) Fosforilación de NF-κB. (n=3; ANOVA dos vías, prueba de Tukey; las graficas muestran datos normalizados de la media + SE; *p<0.05. (n=4; las graficas muestran datos normalizados de la media ± SE; *p> 0.05).

8. DISCUSIÓN

La activación del sistema inmune mediando la producción de citocinas pro-inflamatorias durante la obesidad, es un evento que ha sido reportado desde hace algunos años. Sin embargo, la caracterización de los tipos celulares implicados selectivos de cada órgano y su perfil de activación temporal no ha sido descifrado a la fecha.

En el presente estudio se demostró que la estimulación de las células de la microglía con el lípido saturado ácido palmítico, induce la secreción de diversas citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6). Lo anterior coincide con resultados aún no publicados por nuestro grupo de investigación empleando la línea celular de microglía SIM-A9 y concuerda con lo que se ha reportado anteriormente (Calegari VC *et al*, 2011; Graeber MB *et al*, 2011; Milanski M *et al*, 2009). Además, se demostró que a pesar de identificar la liberación de citocinas proinflamatorias durante la estimulación con lípidos o LPS, no fue posible evidenciar la activación de la proteína TBK1 en cultivo primario de células de la microglía. La única función reportada hasta la fecha de TBK1, en lo que respecta a respuesta inmune, ha sido su capacidad como mediador en la producción de interferón beta (INF- β) y gamma (INF- γ) en respuesta a infecciones virales, a través de TLR3 y TLR4 (Hemmi H *et al*, 2004; Abe T *et al*, 2014). Sumado a los resultados observados en el modelo animal y a la capacidad de dicha proteína para activar NF- κ B (Pomerantz JL *et al*, 1999; Perry AK *et al*, 2004; Abe T *et al*, 2014), es posible suponer que TBK1 podría estar involucrada en la producción de citocinas inflamatorias en presencia de concentraciones altas de SFA libres.

El efecto en la liberación de citocinas pro-inflamatorias inducido por la estimulación de lípidos saturados en la microglía en cultivo y en la línea celular SIM-A9 se analizó en un modelo *in vivo* empleando ratas Wistar. Los resultados mostraron que la administración ICV de LPS o ácido palmítico por 5 días indujo decremento del 75% y 50% en la fosforilación de TBK1 en el ARC del hipotálamo, respectivamente. La región del ARC ha sido propuesta como uno de los principales sitios de neuroinflamación dados por microglía en un contexto lipotóxico (Calegari VC *et al*, 2011; Thaler JP *et al*, 2012; Maric T *et al*, 2014; Valdearcos M *et al*, 2014). Esta aparente contradicción en nuestros resultados puede deberse a la diversidad de mecanismos y tipos celulares que contiene un sistema *in vivo* respecto a uno *in vitro* y al tiempo de estimulación de ambos modelos. En este contexto, Knobloch J *et al*.

2016, demostraron que la estimulación de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) con LPS promueven la liberación de interleucina 2 (IL-2), y la activación subsecuente de macrófagos desencadenando una respuesta inmune de tipo celular (Romagnani S, 1999). Sin embargo, en el contexto de inducción de inflamación crónica, las células Th1 sufren un cambio en las vías de señalización, pasando de la vía MyD88/TRIF hacia la vía TRIF/IKK ϵ /TBK1 y el decremento en la producción de IL-2 (Knobloch J *et al*, 2016). Además, durante la respuesta inflamatoria en nuestro *modelo in vivo* intervienen diversos tipos de celulares en donde probablemente también se encuentren células inmunes periféricas, tales como los linfocitos B y T con capacidad de infiltración al sistema nervioso central (Winer DA *et al*, 2011). Tal es el caso de los linfocitos T activados que pueden atravesar la barrera hematoencefálica e interactuar con la microglía (Engelhardt B & Ransohoff RM, 2005). De hecho, la activación de un proceso inflamatorio temprano inducido por la exposición a dieta alta en grasa durante dos semanas, fomenta efectos de activación inflamatoria a nivel del hipotálamo a tiempos prolongados de hasta 8 días (Thaler JP *et al*, 2012). Con ello, resulta pertinente formular la hipótesis de que la falta de correlación entre la liberación de citocinas y la activación de la vía TBK1 en nuestro modelo coincide con lo observado por el grupo de Knobloch J *et al*, 2016, Proponiendo que la activación aguda temprana de TBK1 en la microglía de las ratas administradas con LPS y/o ácido palmítico, induce la secreción temprana de citocinas inflamatorias, sin embargo, la estimulación inflamatoria crónica de este sistema no se correlaciona con el incremento en la fosforilación de TBK1 en esta ventana de tiempo.

Una de las hipótesis a probar en el presente trabajo fue determinar si la inducción de inflamación hipotalámica crónica alteraba los niveles plasmáticos de glucosa. En el modelo animal no se observó que la administración ICV de SFA o LPS indujera alteraciones en los niveles de glucosa periférica, y esto concuerda con el reportado por Calegari VC *et al* en 2011, quienes demostraron que la administración ICV de ácido esteárico o TNF- α no modifica los niveles de glucosa en plasma. Sin embargo, los autores demuestran un decremento en la glucosa sanguínea al realizar un ensayo de tolerancia a la insulina en tiempos tempranos, hecho que solo fue observado en un punto de la curva (15 min) en nuestro modelo de estudio. Las razones de esta discrepancia pueden ser diversos; en primer lugar, al tratarse de ácidos grasos distintos, es posible tener un nivel de toxicidad diferente (Virtue S & Vidal-Puig A. 2008.) y, si bien, los tiempos de administración fueron iguales (5 días), el número de dosis (2 veces por día), así como la concentración de ácido graso (180 μ M) fue

mayor en el estudio publicado. Sin embargo, a pesar de no observar alteraciones en la homeostasis de glucosa, nuestro protocolo pudo determinar la activación de inflamación evidenciado por la fosforilación del factor nuclear NF- κ B en el ARC del hipotálamo, lo cual asemeja a lo reportado con anterioridad (Calegari VC *et al*, 2011). En cuanto a la activación de TBK1, nuestros datos reflejan que a pesar de evidenciar decremento en su activación inducido por la administración con LPS o ácido palmítico, los animales mostraron aumento del consumo de alimento sensible a la grelina en comparación al control. Con anterioridad, se ha sido reportado que la exposición a una dieta alta en grasas por 11 semanas en ratas Wistar presentan resistencia a la grelina (Naznin F *et al*, 2015); sin embargo, tiempos tempranos de hasta 3 semanas, conservan la sensibilidad a la acción de esta hormona (Briggs DI *et al*, 2014). Adicionalmente, también es posible que señales inflamatorias provenientes del colon o el efecto de anticuerpos específicos contra dicha hormona puedan mediar la resistencia a la grelina o potenciación del efecto orexigénico de la misma, respectivamente (Takagi K *et al*, 2013; Waise TM *et al*, 2015), siendo relevantes en el desarrollo de daño inflamatorio en el contexto de obesidad (Briggs DI *et al*, 2014; Naznin F *et al*, 2015; Ristic N *et al*, 2016). Finalmente, en diversos estudios se ha identificado propiedades anti-inflamatorias a diversos neuropéptidos como la hormona estimulante de alfa melanocitos (MSH- α), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido Y (NPY) (Colombo *et al*, 2008; Gonzalez-Rey E & Delgado M, 2008; Ferreira R *et al*, 2011) e inclusive a la grelina, la cual induce el cambio a fenotipo anti-inflamatorio en la microglía (Siegl D *et al*, 2015; Carniglia L *et al*, 2017). Con todo lo anterior, la activación de la vía de señalización inflamatoria (NF- κ B) en el hipotálamo y el incremento en la acción orexígena de la grelina de nuestros resultados suponemos que puede estar relacionado a uno de los siguientes tres mecanismos: 1) El periodo de inducción de inflamación intracerebral fue muy corto como para afectar la sensibilidad a la grelina. 2) La capacidad anti-inflamatoria de la hormona protege contra el estímulo inflamatorio impidiendo así el desarrollo de cualquier alteración en el cerebro y, por consiguiente, disrupciones en el metabolismo periférico, y 3) La activación del sistema inmune en el hipotálamo potencia la acción orexígena de la grelina.

En resumen, los SFA, principalmente el ácido palmítico, inducen la secreción de citocinas inflamatorias, hecho que involucra la activación de TBK1 en tiempos inferiores a 5 días. Si esta proteína activa directa o indirectamente al factor nuclear NF- κ B, o está involucrada en exposiciones más crónicas no está del todo claro. Un estímulo inflamatorio agudo que

involucra la activación de NF- κ B y disminución de la fosforilación de TBK1 parece incrementar la sensibilidad de las neuronas del ARC hacia la acción orexígena de la grelina.

9. CONCLUSIONES

1. La estimulación de células de la microglía con ácido palmítico promueve la secreción de las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α
2. La estimulación de estas citocinas, está correlacionada con el aumento en la fosforilación de TBK1 y NF- κ B.
3. La administración ICV de ácido palmítico por 5 días induce la activación de NF- κ B y promueve un mayor incremento en la ingesta de alimento sensible a la grelina.
4. Con nuestros resultados proponemos a la proteína TBK1, como un nuevo mediador de neuroinflamación en el contexto de lipotoxicidad.

10. PERSPECTIVAS

Se recomienda realizar experimentos posteriores donde se acorte el tiempo de administración del ácido palmítico con la finalidad de determinar su efecto sobre la activación de TBK1 y la sensibilidad a la insulina.

Identificar si el efecto potenciador en la ingesta de alimento regulada por grelina observada, es debido a su acción directa en las neuronas del núcleo arqueado del hipotálamo o por su efecto antiinflamatorio en las células de la microglía.

11. REFERENCIAS

A.J. N. Paquot. P.J. Lefebvre. 1999. Glucotoxicity and lipotoxicity, two implicated accomplices in the vicious circle of type 2 diabetes. *Rev Med Liege*. 54(6): p. 535-8.

Abe T, Barber GN. 2014. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- κ B activation through TBK1. *J Virol*. May;88(10):5328-41

Aicart RC. Valero RA. Rodriguez CI. 2013. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1808(12):2981-94.

Akabas S. Moore BJ. Lederman SA. Sons JW. 2012. *Textbook of Obesity: Biological, Psychological and Cultural Influences*, Ed. WILEY-BLACKWELL, UK, Pp. 5-6.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37(Suppl 1): S81–90.

Antuna-Puente B. Feve B. Fellahi S. Bastard a P. 2008. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *DIABETES & METABOLISM*. 34(1):2-11.

Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. 2001. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 120(2):337-45.

Baldwin AC. Green CD. Olson LK. Moxley MA. Corbett JA. 2012. A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and β -cell death. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. 302(11):E1390-8.

Banks WA. Burney BO. Robinson SM. 2008. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood–brain barrier. *Peptides*. 29(11):2061-5.

Barquera SS. Campos-Nonato S. Hernández-Barrera L. Pedroza A. Rivera-Dommarco JA. 2013. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos. [Online]. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0036-36342013000800012&script=sci_arttext

Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. 2002. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci.* 2002 Oct 1;22(19):8466-75.

Bonifati DM, Kishore U. 2007. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol.* ;44:999–1010.

Boslem E, Weir JM, MacIntosh G, Sue N, Cantley J, Meikle PJ, Biden TJ. 2013. Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic β -cells. *The journal of biological chemistry* 288(37):26569-82.

Brazis P, Masdeu J, Biller J. *Hypothalamus and pituitary gland.* 4ta ed. 2001: Lippincott Williams & Wilkins.

Briggs DI, Lockie SH, Benzler J, Wu Q, Stark R, Reichenbach A, Hoy AJ, Lemus MB, Coleman HA, Parkington HC, Tups A, Andrews ZB. 2014. Evidence that diet-induced hyperleptinemia, but not hypothalamic gliosis, causes ghrelin resistance in NPY/AgRP neurons of male mice. *Endocrinology.* Jul;155(7):2411-22.

Buckman LB, Hasty AL, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, Weller K, Ellacotta LJ. 2014. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behavior and Immunity;* 35: doi: 10.1016/j.bbi.2013.06.007. 7.

Calder PC. 2013. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *The Proceedings of the Nutrition Society* 72(3):326--336.

Calegari VC, Torsoni AS, Vanzela EC, Araújo EP, Morari J, Zoppi CC, Sbragia L, Boschero AC and Velloso LA. 2011. Inflammation of the Hypothalamus Leads to Defective Pancreatic Islet Function. *J Biol Chem.* 2011 Apr 15; 286(15): 12870–12880.

Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. 2004. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1319–1324.

Carniglia L, Ramírez D, Durand D, *et al.* 2017. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation*;5048616. doi:10.1155/2017/5048616.

Carpenter M. El hipotálamo. 4ta ed. 1994: Neuroanatomía fundamentos. 286-303.

Charles N. Serhan, Peter A. Ward, Derek W. Gilroy. 2010. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press. Pp 1.

Charradi K, Elkahoui S, Limam F, Hassine FB, Aouani E. 2012. Grape seed and skin extract prevents high-fat diet-induced brain lipotoxicity in rat. *Neurochemical Research*, 37(9):2004-13.

Cheng AM, Handa P, Tateya S, Schwartz J, Tang C, Mitra P, Oram JF, Chait A, Kim F. 2012. Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF- κ B activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PLOS ONE*. 7(3):e33917.

Chiang SH, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, Ma JT, Zhou J, Qi N, Westcott D, Delproposto JB, Blackwell TS, Yull FE, Saltiel AR. 2009. The protein kinase IKK epsilon regulates energy balance in obese mice. *Cell* 138:961–975.

Clegg RA. 1998. *Protein Targeting Protocols*. Springer Science & Business Media. Vol. 88. Pp. 227.

Colombo G, Sordi A, Lonati C, Carlin A, Turcatti F, Leonardi P, Gatti S, Catania A. 2008. Treatment with α -melanocyte stimulating hormone preserves calcium regulatory proteins in rat heart allografts. *Brain Behav Immun*. Aug;22(6):817-23.

Coppola A, Diano S. 2007. Hormonal regulation of the arcuate nucleus melanocortin system. *Front Biosci*. 12: p. 3519-30.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. 2003. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 37(4):649-61.

Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ. 2013. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *Neurosci Res.* 2013 September; 91(9): 1143–1151. doi:10.1002/jnr.23242.

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse, BE, Weigle DS. 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggest a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.

Darghosian L1. Free M. Li J. Gebretsadik T. Bian A. Shintani A2. McBride BF. Solus J. Milne G. Crossley GH. Thompson D. Vidaillet H5. Okafor H. Darbar D. Murray KT. Stein CM. 2015. Effect of omega-three polyunsaturated Fatty acids on inflammation, oxidative stress, and recurrence of atrial fibrillation. 115(2):196-201.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. [Endocrinology](#). Oct;146(10):4192-9.

Degerman E, Ahmad F, Chung YW, Guirguis E, Omar B, Stenson L, Manganiello V. 2011. From PDE3B to the regulation of energy homeostasis. *Current Opinion in Pharmacology* 11:676–682.

Delint RI. Maldonado RR. Torre VI. Fuentes ML. Garza OL. Tovar A. Camacho A. 2015. Genetic obesity alters recruitment of TANK-binding kinase 1 and AKT into hypothalamic lipid rafts domains. *Neurochemistry International*. 80:23-32.

Dongsheng C. Tiewen L. 2011. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Journal: annals of the New York academy of sciences*. 1243: E1-E39

Ellacott KLJ. Cone RD. 2006. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1471): 1265–1274.

Encuesta Nacional de Salud Pública y Nutrición. 2012. ENSANUT 2012 Resultados Nacionales. [Online]. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>

Engelhardt B, Ransohoff RM: The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005, 26:485–495.

Ferreira R, Santos T, Viegas M, Cortes L, Bernardino L, Vieira OV, Malva JO. 2011. Neuropeptide Y inhibits interleukin-1 β -induced phagocytosis by microglial cells. *J Neuroinflammation*. Dec 2;8:169

Food and Agriculture Organization Of The United Nations. 2013. The estate of food and agriculture. [Online]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/i3300e/i3300e.pdf>

Gantz I, Fong TM. 2003. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E468–E474.

Gonzalez-Rey E, Delgado M. 2008. Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia and dendritic cells. *Brain Behav Immun*; 22:35–41.

Graeber M. B., Li W., Rodriguez M. L. 2011. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett*. 585, 3798–3805. 10.1016/j.febslet.2011.08.033

Gunaratnam K, Vidal C, Gimble JM, Duque G. 2014. Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in human osteoblasts. *Endocrinology*. 155(1):108-16

Hao S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. 2015. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*. 2016 Jan;51:230-9. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.023. Epub 2015 Aug 31.

Havrankova J, Roth J, Brownstein M. 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 272(5656): p. 827-9.

Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S. 2004. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*. Jun 21;199(12):1641-50.

Hemmings AB, Restuccia FD. 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 4(9):a011189.

Himsworth HP, Kerr RB. 1939. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clin Sci*;4:119–52

Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. 2008. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Molecular Pharmacology*. 74(6),1610-9.

Houten, M. Posner B.I. 1981. Cellular basis of direct insulin action in the central nervous system. *Diabetologia*. 20 Suppl: p. 255-67.

Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. 2012. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*. Sep; 53(9): 2002–2013.

Inokuchi J. 2007. Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127(4):579-86.

International Diabetes Federation. 2014. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf.

Kaltschmidt B and Kaltschmidt C. 2009. NF- κ B in the Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep; 1(3): a001271.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. 2001. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001 50(11):2438-43.

Khanh DV, Choi YH, Moh SH, Kinyua AW, Kim KW. 2014. Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: relationship between energy balance and reward system. *Front. Psychol*. 5:846.

Knobloch J, Chikosi SJ, Yanik S, Rupp J, Jungck D, Koch A. 2016. A systemic defect in Toll-like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide-induced suppression of IL-2-dependent T-cell proliferation in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Jan 1;310(1):L24-39.

Kraegen, E.W. 2001. 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*. 109 Suppl 2: p. S189-201.

Lam CK, Chari M, Lam TK. 2009. CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 24:159-70.

Lazar MA. 2005. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*. 307(5708):373-5.

Le SH, Coan tN, Migrenne S, Magna C. 2013. Targeting lipid sensing in the central nervous system: new therapy against the development of obesity and type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 17(5):545-55.

Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun U, Simons K. 2010. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(51):22050-4.

Liu L1, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH. 2007. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117(6):1679-1689.

Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. 2013. Sustained, neuron-specific IKK/NF- κ B activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener*. 2013; 8: 40.

Maric T, Woodside B, Luheshi GN. 2014. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*. Feb;36:35-45.

Martínez MPB, Varela L, Ferno J, Nogueiras R, Diéguez C, López M. 2010. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1801(3):350-61.

Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, Chen Y, Wang D, Lin X. 2005. The Role of CARMA1 Phosphorylation in T Cell Receptor-induced NF-kappa B activation. *Immunity*. 23(6):575-85.

Mayer C.M. Belsham D.D. 2010. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 151(2): p. 576-85.

Meng G. Liu Y. Lou C. Yang H. 2010. Emodin suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses and NF- κ B activation by disrupting lipid rafts in CD14-negative endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 161(7):1628-44.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA. 2009. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience*. Volume 29. Issue 2. pp 359-370.

Mohammed AM1. Chen F. Kowluru A. 2013. The two faces of protein palmitoylation in islet β -cell function: potential implications in the pathophysiology of islet metabolic dysregulation and diabetes. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 7(3):203-12.

Moon JH. Lee JY. Kang SB. Park JS. Lee BW. Kang ES. Ahn CW. Lee HC. Cha BS. 2010. Dietary monounsaturated fatty acids but not saturated fatty acids preserve the insulin signaling pathway via IRS-1/PI3K in rat skeletal muscle. *Lipids*. 45(12):1109-16.

Morales GMG. 2008. Las balsas lipídicas (lipid rafts) modulan el proceso de comunicación macrófago-bacteria. [Online]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4031/LASBALSAS.pdf?sequence=1>

Morino-Koga S. Yano S. Kondo T. Shimauchi Y. Matsuyama S. Okamoto Y. Suico MA. Koga T. Sato T. Shuto T. Arima H. Wada I. Araki E. Kai H. 2013. Insulin receptor activation through its accumulation in lipid rafts by mild electrical stress. *Journal of cellular physiology*. 228(2):439-46.

Mowers J, Uhm M, Reilly SM, Simon J, Leto D, Chiang SH, Chang L, Saltielar. 2013. Inflammation produces catecholamine resistance in obesity via activation of PDE3B by the protein kinases IKK ϵ and TBK1 *eLife* 2013; 2: e01119.

Muñoz MC, Giani JF, Mayer MA, Toblli JE, Turyn D, Dominici FP. 2009. TANK-binding kinase 1 mediates phosphorylation of insulin receptor at serine residue 994: a potential link between inflammation and insulin resistance. *J Endocrinol.* 201(2):185-97. doi: 10.1677/JOE-08-0276.

Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K. 2002. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol.* 174(2):283-8.

Naznin F, Toshinai K, Waise TMZ, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, Nakazato M. 2015. Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation. *The Journal of Endocrinology*, 226(1), 81–92. <http://doi.org/10.1530/JOE-15-0139>

Niwuwenhuys R. Voogd J. Van Hujizen C. Diencéfalo hipotálamo. 4ta ed. 2009: El sistema nervioso central humano. 289-336.

Oakley FD, Smith RL, Engelhardt JF. 2009. Lipid Rafts and Caveolin-1 Coordinate Interleukin-1 β (IL-1 β)-dependent Activation of NF κ B by Controlling Endocytosis of Nox2 and IL-1 β Receptor 1 from the Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry.* 284(48): 33255–33264.

Obici S, Rossetti L. 2003. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology.* 2003 Dec;144(12):5172-8.

Oh H, Boghossian S, York DA, Park YM. 2013. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Research.* 1537:191-200.

O'Neill LA & Hardie DG. 2013. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493(7432):346---355.

O'Neill LA. 2011. Counter-regulation in the IKK family. *Biochemical journal.* 434(1):e1-2.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. 2009. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 9(1):35-51.

Padilla A, Descorbeth M, Almeyda AL, Payne K, De Leon M. 2011. Hyperglycemia magnifies Schwann cell dysfunction and cell death triggered by PA-induced lipotoxicity. *Brain Research.* 1370:64-79.

Park HR, Kim YJ, Park KY, Lee J. 2013. Lipotoxicity of palmitic Acid on neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Toxicological Research.* 27(2):103-10.

Perello M, Zigman JM. 2012. The role of ghrelin in reward-based eating. *Biol Psychiatry.* 72(5):347-53.

Perreault M, Istrate N, Wang L, Nichols AJ, Tozzo E, Stricker-Krongrad A. 2004. Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28(7):879-85.

Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. 2004. Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection. *J Exp Med.* 2004 Jun 21; 199(12): 1651–1658.

Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L. 2005. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* 2005 Apr 21;434(7036):1026-31.

Pomerantz JL, Baltimore D. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J.* 18(23):6694-704.

Porte D, Baskin DG, Schwartz MW. 2005. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes.* 2005 May;54(5):1264-76.

Pratt WC, Voet JG, Voet D. 2007. *Fundamentos de Bioquímica.* Editorial medica Panamericana: Madrid. pp. 266-267.

Purkayastha S, Cai D. 2013. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Molecular Metabolism*. 2(4):356-363.

Rachek LI. 2014. Free Fattyacids and skeletal muscle insulin resistance. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 121: 267–292.

Reilly SM, Ahmadian M, Zamarron BF, Chang L, Uhm M, Poirier B, Peng X, Krause DM, Korytnaya E, Neidert A, Liddle C, Yu RT, Lumeng CN, Oral EA, Downes M, Evans RM, Saltiel AR. 2015. A subcutaneous adipose tissue-liver signalling axis controls hepatic gluconeogenesis. *Nat Commun*. 2015 Jan 12;6:6047. doi: 10.1038/ncomms7047.

Reilly SM, Chiang SH, Decker SJ, Chang L, Uhm M, Larsen MJ, Rubin JR, Mowers J, White NM, Hochberg I, Downes M, Yu RT, Liddle C, Evans RM, Oh D, Li P, Olefsky JM, Saltiel AR. 2013. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-epsilon improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Natural Medicines* 19:313–321.

Reis WL, Yi CY, Gao Y, Tschöp MH, and Stern JE. 2015. Brain Innate Immunity Regulates Hypothalamic Arcuate Neuronal Activity and Feeding Behavior. *Endocrinology*. 2015 Apr; 156(4): 1303–1315.

Resh MD. 2006. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science signaling*. (359):re14.

Riaz S. 2015. Study of Protein Biomarkers of Diabetes Mellitus Type 2 and Therapy with Vitamin B1. *J Diabetes Res*.

Ristic N, Stevanovic D, Nestic D, Ajdzanovic V, Rakocevic R, Jaric I, Milosevic V. 2016. Diet-Induced Obesity and Ghrelin Effects on Pituitary Gonadotrophs: Immunohistomorphometric Study in Male Rats. *Cell J*. Winter;17(4):711-9

Roden M. Price TB. Perseghin G. Petersen KF. Rothman DL. Cline GW. Shulman GI. 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J ClinInvest*. 97(12):2859-65.

Romagnani S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):285-94.

Samuel V.T. Shulman G.I. 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*. 148(5): p. 852-71.

Sato S. Sugiyama M. Yamamoto M. Watanabe Y. Kawai T. Takeda K. Akira S. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-bindingkinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology*. 171(8):4304-10.

Schafer DP, Stevens B. 2015. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. doi: 10.1101/cshperspect.a020545.

Scheen A.J. 2000. From obesity to diabetes: why, when and who? *Acta Clin Belg*. 55(1): p. 9-1.

Schwartz MW. Seeley RJ. Tschöp MH. Woods SC. Morton GJ. Myers MG. D'Alessio D. 2013. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature*. 503(7474): p. 59-66.

Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. 1998. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(5):2498-502.

Siegl D, Midura EF, Annecke T, Conzen P, Caldwell CC, Tschoep J. 2015. The Effect of Ghrelin upon the Early Immune Response in Lean and Obese Mice during Sepsis *PLoS One*; 10(4): e0122211.

Solinas G, Karin M. 2010. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*. 24(8):2596-2611.

Song G. Ouyang G. Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*. Vol 9, No 1, pp. 59-71.

Souza CO. Teixeira AA. Lima EA. Batatinha HA. Gomes LM. Carvalho-Silva M. Mota IT. Streck EL. Hirabara SM. Rosa Neto JC1. 2014. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPAR α . *Mediators of inflammation*. 2014:582197.

Szablewski L. 2011. *Glucose Homeostasis and Insulin Resistance*. Bentham Science Publishers. Polonia.

Taghibiglou C. Bradley CA. Gaertner T. Li ., Wang Y. Wang YT. 2009. Mechanisms involved in cholesterol-induced neuronal insulin resistance.

Takagi K, Legrand R, Asakawa A, Amitani H, François M, Tennoune N, Coëffier M, Claeysens S, do Rego JC, Déchelotte P, Inui A, Fetissova SO. 2013. Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans. *Nat Commun.* Oct 25; 4: 2685.

Talbot NA. Wheeler-Jones CP. Cleasby ME. 2014. Palmitoleic acid prevents palmiticacid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Molecular and cellular endocrinology* 5;393(1-2):129-42.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012 Jan;122(1):153-62. doi: 10.1172/JCI59660. Epub 2011 Dec 27.

Thiriet M. 2012. Intracellular Signaling Mediators in the Circulatory and Ventilatory Systems. Springer. 280-81.

Thorne RF. RalstonKJ.de Bock CE. Mhaidat NM. Zhang XD. Boyd AW. Burns GF. 2010. Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1803(11):1298-307.

Tojima Y. Fujimoto A. Delhase M. Chen Y. Hatakeyama S. Nakayama K. KanekoY. Nimura Y. Motoyama N. Ikeda K. Karin M. Nakanishi M. 2000. NAK is an IκB kinase-activating kinase. *Nature* 404, 778-782.

Toledo K. Aranda M. Asenjo S. Sáenz K. Bustos P. 2013. Unsaturated fatty acids and insulin resistance in childhood obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 18:1-8.

Ünal D. 2012. Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system. *Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi.* 39(2): p. 310-315.

Unger J, McNeill TH, Moxley RT 3rd, White M, Moss A, Livingston JN. 1989. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*. 31(1): p. 143-57.

Unger RH, Orci L. 2000. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *International Journal of Obesity*. 24, Suppl 4, S28-S32.

Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK. 2014. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell reports*. Volume 9, Issue 6, p2124–2138.

Veluthakal R, Irina Chvyrkova I, Marie Tannous M, McDonald P, Amin R, Hadden T, Thurmond DC, Quon MJ, Kowluru A. 2005. Essential Role for Membrane Lipid Rafts in Interleukin-1 Induced Nitric Oxide Release from Insulin-Secreting Cells Potential Regulation by Caveolin-1. *American Diabetes Association*. 54 (9) 2576-2585.

Virtue S, Vidal-Puig A. 2008. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 6(9):e237.

Vogt MC, Bruning JC. 2013. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab*. 24(2): p. 76-84.

Waise TM, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, Nakazato M. 2015. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 4;464(4):1157-62.

Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. 2011. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response. *Neuron Glia Biology*. Feb; 7(1):47-53.

Wang Z, Liu D, Wang F, Liu S, Zhao S, Ling EA, Hao A. 2012. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *British Journal of Nutrition*. Volume 107. Issue 02. pp 229-241.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The journal of clinical investigation*. 112 (12):1796-808.

Weissmann L, Quaresma PG, Santos AC, de Matos AH, Pascoal VD, Zanotto TM1, Castro G, Guadagnini D, da Silva JM, Velloso LA, Bittencourt JC, Lopes-Cendes I, Saad MJ, Prada PO. 2014. IKK ϵ is key to induction of insulin resistance in the hypothalamus, and its inhibition reverses obesity. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3334-45. doi: 10.2337/db13-1817.

Williams LM. 2012. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society* 71, 521–533.

Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Ping Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong H, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, and Engleman EG. 2011. B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. *Nat Med*. 2011 May; 17(5): 610–617.

Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park JY, Lee KU, Kim MS. 2009. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)*. 17(10):1861-1865.

Wong KL, Wu YR, Cheng KS, Chan P, Cheung CW, Lu DY, Su TH, Liu ZM, Leung YM. 2014. Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *66(6):1106-13*.

World Health Organization. 2014. Obesity and overweight. [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

World Health Organization. 2016. Informe mundial sobre la diabetes: Resumen de orientación. [Online]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204877/1/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf

World Health Organization: World Health Organization, International Diabetes Federation, editors. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva (Switzerland): WHO Press; 2006.

Wu Y, Yu Y, Szabo A, Han M, and Feng Huang X. 2014. Central Inflammation and Leptin Resistance Are Attenuated by Ginsenoside Rb1 Treatment in Obese Mice Fed a High-Fat Diet. *PLoS One*. ; 9(3): e92618.

Xiaolei M. Helgason E. Phung QT. Quan CL. Iyer RS. Lee MW. Bowman KK. Starovasnik MA. Dueberb EC. 2012. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(24): 9378–9383.

Yagoob P. Shaikh SR. 2010. The nutritional and clinical significance of lipid rafts. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 13(2):156-66.

Yang J. Gibson B. Snider J. Jenkins CM. Han X. Gross RW. 2005. Submicromolar concentrations of palmitoyl-CoA specifically thioesterify cysteine 244 in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibiting enzyme activity: a novel mechanism potentially underlying fatty acid induced insulin resistance. *Biochemistry*. 44(35):11903-12.

Yang M. Wei D. Mo C. Zhang J. Wang X. Han X. Wang Z. Xiao H. 2013. Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit. *Lipids in health and disease*.12: p. 10.

Yaqoob P. 2009. The nutritional significance of lipid rafts. *Annual Review of Nutrition*. 228(2):439-46.

Yi CX. Tschöp MH. Woods SC. Hofmann SM. 2012. High-fat-diet exposure induces IgG accumulation in hypothalamic microglia. *Dis Model Mech*. 2012 Sep;5(5):686-90. doi: 10.1242/dmm.009464.

Zhang X. Zhang G. Zhang H. Karin M. Bai H. Cai D. 2008. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link over nutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 135(1):61-73.

Zhao W. 2013. Negative regulation of TBK1-mediated antiviral immunity. *FEBS Letters*. 587(6):542-8.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Roger Alexis Maldonado Ruiz

Candidato para el grado de

Maestro en ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: TBK1 COMO MODULADORA DE LA LIBERACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS EN LA MICROGLÍA DE RATAS WISTAR Y SU EFECTO EN LA GENERACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y DIABETES TIPO 2

Campo de estudio: Ciencia básica

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 4 de julio de 1992, hijo de Fernando Maldonado Castillo y Mercedes Ruiz Gutiérrez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2013.