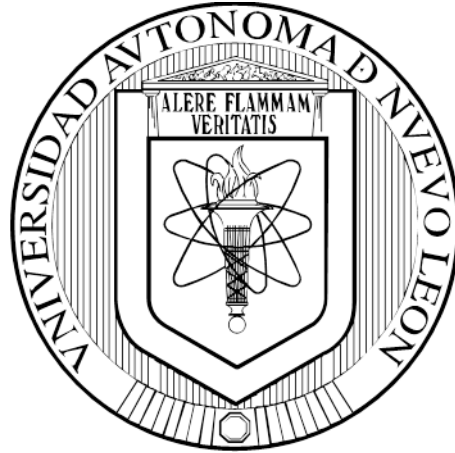


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CERAMIDA C24:0 SOBRE LA  
RESISTENCIA A LA INSULINA, LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y  
EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN MODELOS  
*IN VIVO* E *IN VITRO***

**POR**

**Q.C.B. FRANCISCO JAVIER BUSTOS MARTÍNEZ**

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

**JULIO, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CERAMIDA C24:0 SOBRE LA  
RESISTENCIA A LA INSULINA, LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y  
EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN MODELOS  
*IN VIVO* E *IN VITRO***

**POR**

**Q.C.B. FRANCISCO JAVIER BUSTOS MARTINEZ**

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

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Neurobiología de la Obesidad de la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio del Departamento De Fisiología de la Nutrición, ubicado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México.

Este trabajo fue dirigido por la Dra. C. Ana María Rivas Estilla como director de tesis, así como por el Dr. C. Alberto Camacho Morales como codirector y el Dr.C. Salvador Luis Said y Fernández, como miembro de la comisión de tesis. Así mismo se contó con la valiosa colaboración del Dr. Armando Roberto Tovar Palacio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y de la Estudiante Licenciado en Biotecnología Genómica (LBG) Alaska Monserrat Torres Soto.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CERAMIDA C24:0 SOBRE LA RESISTENCIA A LA INSULINA, LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN MODELOS IN VIVO E IN VITRO**

**Aprobación de la tesis:**



---

**DRA. C. ANA MARIA G. RIVAS ESTILLA**  
Directora de la Tesis



---

**DR.C. ALBERTO CAMACHO MORALES**  
Co-Director de la Tesis



---

**DR.C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNANDEZ**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

**DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## Índice

<i>Aprobación de la tesis:</i> .....	4
<i>Agradecimientos</i> .....	7
<i>Dedicatoria</i> .....	8
<i>Índice de figuras</i> .....	9
<i>Nomenclatura</i> .....	11
<i>Resumen</i> .....	13
<i>Introducción</i> .....	14
<i>2. Obesidad</i> .....	17
<i>2.1 Clasificación de la obesidad</i> .....	17
<i>2.2 Datos Epidemiológicos</i> .....	18
<i>2.3 Causas de la obesidad</i> .....	22
<i>2.4 Obesidad como factor de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)</i> .....	23
<i>2.5 Regulación del metabolismo energético: papel de la insulina</i> .....	24
<i>2.5.1 Vías de señalización de la insulina</i> .....	27
<i>2.5.1.1 Vía de señalización de las MAP cinasas</i> .....	28
<i>2.5.1.2 Vía de señalización de PI3K</i> .....	30
<i>2.6 Resistencia a la insulina</i> .....	31
<i>2.7 Efectos subcelulares por acumulación de lípidos en el desarrollo de resistencia a la insulina</i> .....	33
<i>2.7.1 La lipotoxicidad es un mecanismo patogénico que genera daño metabólico en órganos claves para el desarrollo de DMT2</i> .....	33
<i>2.7.2 Generación de lípidos lipotóxicos: Síntesis de ceramidas</i> .....	35
<i>2.8 Ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados: Especies de lípidos clave en el desarrollo de daño lipotóxico tisular asociado a la generación de diabetes</i> .....	37
<i>2.9 La lipotoxicidad favorece la activación de estrés al retículo endoplásmico</i> .....	39
<i>2.10 La lipotoxicidad favorece la activación de disfunción mitocondrial</i> .....	42
<i>Justificación</i> .....	46
<i>Hipótesis</i> .....	47
<i>Objetivos</i> .....	48
<i>5.1 Objetivo general</i> .....	48
<i>5.2 Objetivos específicos</i> .....	48
<i>Material y métodos</i> .....	49

6.1 Material.....	49
6.1.2 Líneas celulares .....	49
6.1.3 Reactivos .....	49
6.1.4 Anticuerpos .....	50
6.1.5 Animales y manejo .....	50
6.2 Estrategia experimental .....	50
6.3 Metodología .....	51
6.3.1 Cultivo celular.....	51
6.3.2 Citotoxicidad, hepática y de adipocitos durante la incubación con la ceramida C24:0.....	51
6.3.3 Protocolo de diferenciación de la línea celular 3T3L1 y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs).....	52
6.3.3.1 Tinción de rojo oleoso.....	52
6.3.4 Evaluar el efecto de la ceramida C24:0 sobre la fosforilación de la proteína AKT, y la expresión tanto de BiP como de MFN2 .....	53
6.3.5 Animales y manejo .....	53
6.3.6 Administración de ceramida C24:0 en el modelo murino .....	54
6.3.7 Pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) e insulina (ITT) .....	54
6.3.8 Disección y homogenizado de tejidos y recolección de suero .....	55
6.4 Extracción de proteínas (cultivo celular) .....	55
6.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	55
6.5 Western blot .....	56
6.6 Evaluación el efecto de la ceramida C24:0 sobre la dinámica mitocondrial.....	57
6.7 Evaluación el efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés al retículo endoplásmico. ....	57
6.8 Estadística .....	58
Resultados .....	59
Discusión.....	71
Conclusión .....	76
Referencias.....	77

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer primeramente a mi familia, que siempre han creído en mi y han estado para apoyarme en cada una de mis decisiones, tanto personales como laborales.

Así como, también, dejar escrito mi agradecimiento a una persona muy especial, atenta, comprensiva, que quiero con toda el alma, que me estuvo apoyando en todo momento (bueno o malo), y que me ha mostrado mil veces en su propio ejemplo lo que significa ser una gran persona, José Cano.

A todos los compañeros y compañeras de laboratorio quisiera darles las gracias por los buenos momentos que hemos compartido. Creo que todos hemos aprendido y aprendemos continuamente de todos y de nosotros mismos, tanto profesional como personalmente.

En especial a mis compañeras y mejores amigas: Gabriela, Mayra y Alaska, por siempre escucharme, aconsejarme, estar en momentos difíciles, apoyarnos mutuamente; por los buenos ratos que pasamos platicando, comiendo, riéndonos y siempre sacarme una sonrisa.

A los Dres. Miguel Dector y Carmen Barboza, los cuales hicieron que me interesara plenamente en la biología molecular, por escucharme y aconsejarme sobre los estudios de posgrado.

A Robbi por enseñarme la técnica de Western blot, consejos y ayuda cuando la necesite, por ser una gran compañera y excelente persona.

A Luis Ángel por ser un gran compañero y excelente persona, ayudarme en algunos aspectos.

A Rogger por ayudarme bastante en mi proyecto, ya sea en pruebas estadísticas, en mi modelo animal y darme consejos.

A la Dr. Sonia Lozano por ayudarme en los momentos difíciles del proyecto, gracias a su ayuda pude completar mi proyecto.

Al Dr. Alberto Camacho, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y poder realizar este gran proyecto.

## **Dedicatoria**

Esta tesis esta dedicada especialmente a mis padres Francisco y María, gracias a su apoyo incondicional estoy aquí, así como a cada una de las personas que creyeron en mi desde un principio: familiares, amigos, doctores.



## Índice de figuras

Figura 1 Prevalencia mundial de obesidad en hombres de 18 años en adelante (IMC $\geq 25$ Kg/m <sup>2</sup> ) .....	19
Figura 2 Prevalencia mundial de obesidad en mujeres de 18 años en adelante (IMC $\geq 25$ Kg/m <sup>2</sup> ) .....	19
Figura 3 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo .....	20
Figura 4 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo .....	21
Figura 5 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo. ....	21
Figura 6 Causas de la obesidad .....	22
Figura 7 Número de personas con diabetes en el mundo, así como por región en 2017 y 2045 (20-79 años.) .....	23
Figura 8. Regulación de la secreción de insulina .....	26
Figura 9 Estructura del Receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor .....	27
Figura 10 Mecanismo de señalización desencadenado por las Mapquinas .....	29
Figura 11 Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina.....	29
Figura 12 Regulación del transporte de glucosa por la insulina de Rab-GTP (activo) de GLUT4 a la membrana plasmática.....	30
Figura 13 Relaciones intercelulares dadas en la resistencia a la insulina.....	31
Figura 14 Metabolismo de esfingolípidos e interconexión de esfingolípidos bioactivos.....	35
Figura 15 Ceramidas y Disfunción Metabólica .....	36
Figura 16 Mecanismo de activación sobre el estrés al retículo endoplásmico.....	40
Figura 17 Cadena de transporte de electrones .....	42
Figura 18 Protocolo de administración de la ceramida C24:0.....	53
Figura 19 Ensayo de viabilidad celular MTT .....	58
Figura 20 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la diferenciación celular hacia linaje adipogénico en la línea celular 3T3L1.....	60
Figura 21 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la diferenciación celular de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo hacia linaje adipogénico .....	61
Figura 22 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la fosforilación de la proteína Akt .....	62
Figura 23 Efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés del retículo endoplásmico y alteraciones en la dinámica mitocondrial en la línea celular HUH7 .....	63
Figura 24 Efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés del retículo endoplásmico y alteraciones en la dinámica mitocondrial en la línea celular 3T3L1 .....	63
Figura 25 Efecto de la ceramida C24:0 sobre el peso de ratones después de la estimulación con ceramida durante 28 días .....	64
Figura 26 Efecto de la ceramida C24:0 en el consumo de alimento y eficiencia de alimento de los grupos control salina y ceramida .....	65
Figura 27 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la concentración de glucosa en sangre de ratones.....	66
Figura 28 Efecto de la ceramida C24:0 en el tejido Hepático sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial .....	67
Figura 29 Efecto de la ceramida C24:0 en el tejido adiposo sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial .....	68
Figura 30 Efecto de la ceramida C24:0 en el músculo esquelético sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial .....	69

## Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de la obesidad según los valores de IMC, establecidos por la OMS. Muestra los rangos de obesidad y el riesgo asociado dependiente del IMC (Modificado de WHO, 2016).....	18
Tabla 2 Líneas celulares utilizadas para los experimentos de este proyecto de resistencia a la insulina, estrés al retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial.....	49
Tabla 3 Reactivos utilizados durante los experimentos. Ceramida C24:0 utilizada para todos los ensayos posteriores, albumina como acarreador de esta. ....	49
Tabla 4 Anticuerpos utilizados en el proyecto. P-Akt para medir la resistencia a la insulina, BiP para estrés al retículo, MFN2 para disfunción mitocondrial y Actina como control de carga. ....	50

## **Nomenclatura**

<b>°C</b>	<b>Grados Celsius</b>
<b>Ac</b>	<b>Anticuerpo</b>
<b>AGL</b>	<b>Ácidos Grasos Libres</b>
<b>Akt</b>	<b>Proteína Quinasa B</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Análisis de Varianza</b>
<b>ASC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo</b>
<b>BiP</b>	<b>Proteína de unión a inmunoglobulina</b>
<b>BSA</b>	<b>Albumina Sérica Bovina</b>
<b>CAF</b>	<b>Dieta de Cafetería</b>
<b>Cer</b>	<b>Ceramidas</b>
<b>CO2</b>	<b>Dióxido de carbono H2O Agua</b>
<b>DMT2</b>	<b>Diabetes Mellitus Tipo 2</b>
<b>g</b>	<b>Fuerza de gravedad</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitros</b>
<b>GTT</b>	<b>Prueba de Tolerancia a la Glucosa</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>HFD</b>	<b>Dieta Alta en Grasa</b>
<b>HSD</b>	<b>Dieta Alta en Azúcar</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de Masa Corporal</b>
<b>ITT</b>	<b>Curva de tolerancia ala insulina</b>
<b>Kcal</b>	<b>Kilo caloría</b>

<b>M</b>	<b>Molaridad</b>
<b>MFN2</b>	<b>Mitofusina 2</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>MSC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales</b>
<b>mV</b>	<b>miliVoltios</b>
<b>nM</b>	<b>Nano Molar</b>
<b>pAkt</b>	<b>Proteína quinasa B fosforilada</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrógeno</b>
<b>PP2A</b>	<b>Proteína fosfatasa 2</b>
<b>SD</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>SDS-PAGE sodio</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio</b>
<b>seg</b>	<b>Segundos</b>
<b>SEM</b>	<b>Error estándar</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris-buffered saline</b>
<b>TBST</b>	<b>Tris-buffered saline tween</b>
<b>WB</b>	<b>Western blot</b>
<b>μL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>μM</b>	<b>Micromolar</b>

## Resumen

**Introducción:** Las ceramidas son lípidos que constituyen la estructura básica precursora de los esfingolípidos, que incluyen a las esfingomielinas, los glicolípidos y los gangliósidos. Evidencia *in vitro* y en humanos obesos han demostrado que las ceramidas se asocian con el desarrollo de resistencia a insulina. De interés, la acumulación de ceramidas en el músculo promueve resistencia a la insulina e incremento de glucosa en él. A nivel molecular, las ceramidas inhiben la fosforilación de Akt, a través de la activación de la proteína fosfatasa PP2A y de la translocación de Akt a la membrana plasmática para su consiguiente activación. Sin embargo, no todas las especies de ceramidas muestran efectos negativos sobre la activación de AKT, por lo que es necesario la identificación de nuevas especies que fomentan el deterioro metabólico. **Hipótesis:** La ceramida C24:0 induce resistencia a la insulina a través de la activación de estrés del retículo endoplásmico y alteración de la dinámica y/o función mitocondrial. **Metodología:** Se realizó un ensayo de diferenciación hacia linaje adipogénico utilizando las líneas celulares 3T3L1 y MCS's, las cuales en conjunto con la línea celular HUH7 se evaluaron *in vitro*: tanto para determinar su resistencia a la insulina, como la alteración de dos mecanismos involucrados (estrés del retículo endoplásmico y alteración de la dinámica mitocondrial) mediante un análisis de Western blot. Resultados: la estimulación con ceramida C24:0 provocó resistencia a la insulina, estrés al retículo endoplásmico, así como alteraciones en la dinámica mitocondrial. Además, se identificaron estas mismas alteraciones en un modelo murino, anudado a un incremento en las concentraciones de glucosa (al realizar la curva de tolerancia a la glucosa), un decremento en el peso corporal, así como menor consumo de alimento. **Conclusión:** La estimulación con ceramida C24:0 induce alteraciones a nivel molecular, fomentando la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico, así como alteraciones en la dinámica mitocondrial tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*.



Dr. C. Ana María G. Rivas Estilla

## Capítulo 1

### Introducción

La obesidad y el sobrepeso son definidos como una acumulación anormal o excesiva de grasa en diferentes órganos o tejidos, la cuál puede ser perjudicial para la salud (World Health Organization/Regional Office For The Eastern Mediterranean, 2018). Se propone que esta acumulación anormal o excesiva de grasa se relaciona a una desregulación entre la ingesta y el consumo de alimentos hipercalóricos, adicional a la falta de actividad física y factores genéticos, ambientales y psicológicos; entre otros.

El índice de masa corporal (IMC) es uno de los indicadores más utilizados para la clasificación de la obesidad, que incluye la relación entre el peso y la talla del individuo. El IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kgs entre el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Un IMC igual o mayor a 25 se categoriza como sobrepeso y un IMC mayor o igual a 30 como obesidad (Manuel Moreno, 2012). Según datos de la Organización Mundial de la Salud en 2016, se estimó que a nivel mundial más de 1900 millones de hombres adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos, en tanto que en ese mismo año, el 39% de las mujeres adultas de 18 o más años del total de la población mundial tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (WHO, 2016). De interés, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial con mayor número de personas con obesidad y sobrepeso; mostrando alrededor del 70% de la población adulta con obesidad, presentando con ello uno de los principales retos que enfrenta nuestro país. En niños, las prevalencias de obesidad se ubican en 2012 (17.4%) y 2016 (18.6%).

La presencia de obesidad no sólo representa un riesgo estético, sino que se ha asociado al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Entre ellas, dislipidemias, hipertensión, cáncer, hipercolesterolemias, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 1 y tipo dos (DMT1 y DMT2), hepatopatías, enfermedades coronarias, entre otras (Cárdenas, 2018). Uno de los mecanismos moleculares que trata de explicar el efecto deletéreo de la obesidad en la salud se relaciona con el efecto tóxico que ejerce la acumulación de lípidos en el cuerpo. Se trata de un mecanismo metabólico denominado

lipotoxicidad. La lipotoxicidad se refiere al aumento en la cantidad de tejido adiposo blanco y a la liberación de lípidos de este órgano por lipólisis y su acumulación en diversos órganos o tejidos periféricos que participan en la regulación de la homeóstasis de energía. El efecto lipotóxico debido a la acumulación de los lípidos se ha detectado en los hepatocitos, hígado, músculo, corazón, riñón e inclusive en el cerebro (Jo, Okazaki, Moon, & Zhao, 2016). Posterior a la acumulación, el aumento de los ácidos grasos intracelulares tiene como consecuencia la activación de vías metabólicas no oxidativas, como lo es, la formación de ceramidas, la degradación lisosomal, la generación de estrés de retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial (Sámano, Victoria, Durán, Antonio, & Oropeza, 2013).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio y algunos otros publicados por diferentes grupos alrededor del mundo, se ha reportado, en modelos animales, un efecto lipotóxico asociado con la exposición crónica de una dieta alta en grasa en modelos animales. En modelos de programación materna expuestos a tres tipos de dieta: dieta alta en grasa (HFD), cafetería (CAF) y dieta alta en azúcar (HSD), se identificaron alteraciones en algunos parámetros metabólicos y acumulación de grasa que se correlacionan con un incremento en la fusión mitocondrial hipotalámica y estrés del retículo endoplásmico. Estas alteraciones son potencialmente debidas al exceso de calcio en la mitocondria (Diaz et al., 2015). De interés, en nuestro laboratorio se identificó que la descendencia de madres alimentadas con dieta alta en grasa y/o azúcar durante el embarazo y la lactancia, presentaron un incremento significativo en la concentración de ciertas especies lipídicas, entre las que destacó la que destacó la ceramida C24:0. Además, también identificamos que el incremento de la ceramida C24:0 también era evidente en la sangre de sujetos obesos con y sin DMT2. Se ha identificado que las especies de ceramida C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, C24:1, muestran una mayor concentración en el plasma de pacientes con DMT2, y de hecho se ha propuesto como un modulador negativo de la vía de señalización de la insulina, mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína AKT/PKB (Chaurasia & Summers, 2015). A pesar de los avances en la identificación de candidatos moleculares que correlacionan con el estado obeso-diabético en la población humana, aún no está del todo claro qué especie de ceramida tiene el mayor potencial para promover resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes en el humano.

En este trabajo nos enfocamos en determinar el efecto de la ceramida 24:0 sobre la generación de estrés de retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial y su relevancia en el desarrollo de resistencia a insulina empleando modelos *in vitro* e *in vivo*.



## Capítulo 2

### 2. Obesidad

La obesidad y el sobrepeso son definidos como una acumulación anormal o excesiva de grasa en diferentes órganos o tejidos, la cual se traduce en un aumento del peso corporal. La grasa tiende a acumularse principalmente en el área abdominal, como grasa visceral y subcutánea; aunque también se acumula en diferentes regiones del cuerpo (Brillat, 1826)(World Health Organization/Regional Office For The Eastern Mediterranean, 2018).

#### 2.1 Clasificación de la obesidad

La obesidad en el hombre adulto se clasifica con referencia al peso normal, con base al contenido de grasa que presenta cada persona, siendo este rango en un rango del 15 - 20% del peso corporal total, y las mujeres entre el 25 - 30% del peso corporal total (Dávila-Batista et al., 2016) (WHO, 2016). La identificación de grasa corporal es aplicada con el uso de la medición de los pliegues subcutáneos en distintos puntos (bicipital, tricípital, subescapular y suprailíaco), cuya suma se considera un indicador de la grasa subcutánea (Moreno et al., 2001); así como, la medición de la impedancia bioeléctrica, la cual muestra la oposición que representa un cuerpo-en nuestro caso un tejido biológico-al paso de una corriente eléctrica, permitiendo determinar así el contenido total de agua corporal (Regueiro-gómez, 2015). Asumiendo que los tejidos tienen una hidratación constante, se puede calcular el contenido de la masa libre de grasa y la masa grasa corporal mediante la aplicación de ecuaciones apropiadas. De manera general, se emplea el índice de masa corporal (IMC) como el indicador internacional más simple para determinar el grado de sobrepeso-obesidad de un sujeto. El IMC es la relación entre el peso y la talla y se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

Los parámetros establecidos por la OMS son los siguientes:

- Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso.
- Un IMC igual o superior a 30 determina obesidad.

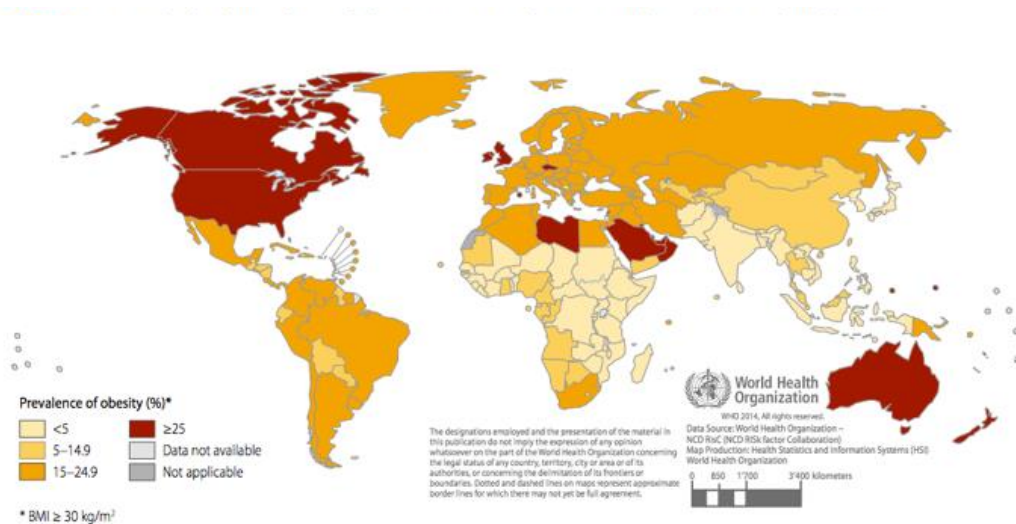
El IMC proporciona la medida más útil para el diagnóstico de sobrepeso y la obesidad en la población, puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Las ventajas de utilizar el IMC se basan en que existe una buena correlación poblacional (0.7 – 0.8) con el contenido de grasa corporal, y porque se ha demostrado una correlación positiva con el riesgo relativo de mortalidad (general y cardiovascular), independiente del sexo. Esta correlación es la que ha determinado los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad (Godes, Morillas, & Pitarch, 2015).

Clasificación	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo Asociado a la salud
Normo Peso	18.5 – 24.9	Promedio
Exceso de Peso	≥ 25	
Sobrepeso o Pre Obeso	25 - 29.9	AUMENTADO
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9	AUMENTO MODERADO
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9	AUMENTO SEVERO
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40	AUMENTO MUY SEVERO

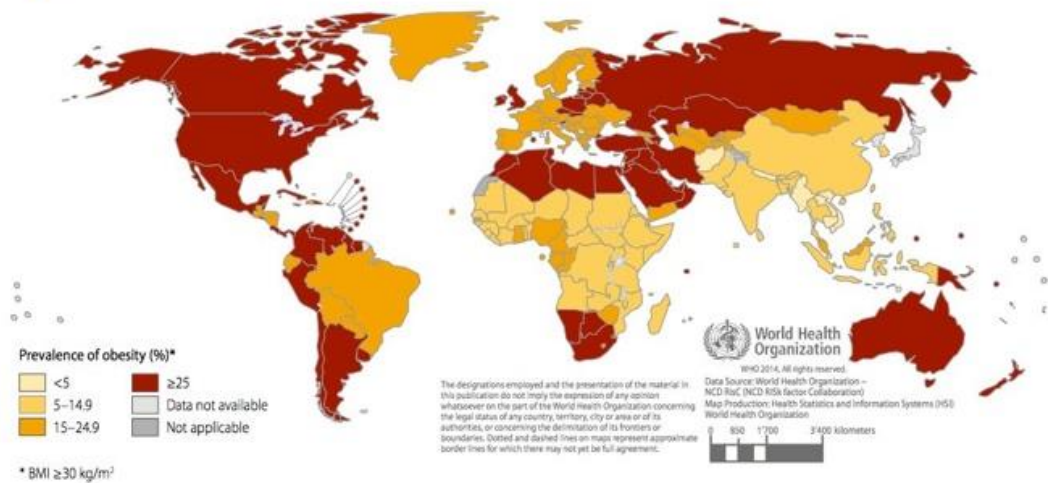
*Tabla 1 Clasificación de la obesidad según los valores de IMC, establecidos por la OMS. Muestra los rangos de obesidad y el riesgo asociado dependiente del IMC (Modificado de WHO, 2016)*

## 2.2 Datos Epidemiológicos

La obesidad y el sobrepeso representan uno de los principales retos de salud de nuestra época, por lo que la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), así como diversos gobiernos alrededor del mundo, han señalado la necesidad de considerar el problema de la obesidad como de urgencia mundial. Según un estudio publicado por la OMS en 2016, se estima que en el ámbito mundial más de 1900 millones de hombres adultos con 18 o más años presentaba sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones se ubicaban en la clasificación de obesos, en tanto el 39% de las mujeres adultas con 18 o más años mostraba sobrepeso, y el 13% eran obesas (WHO, 2016) (Figuras 1 y 2).



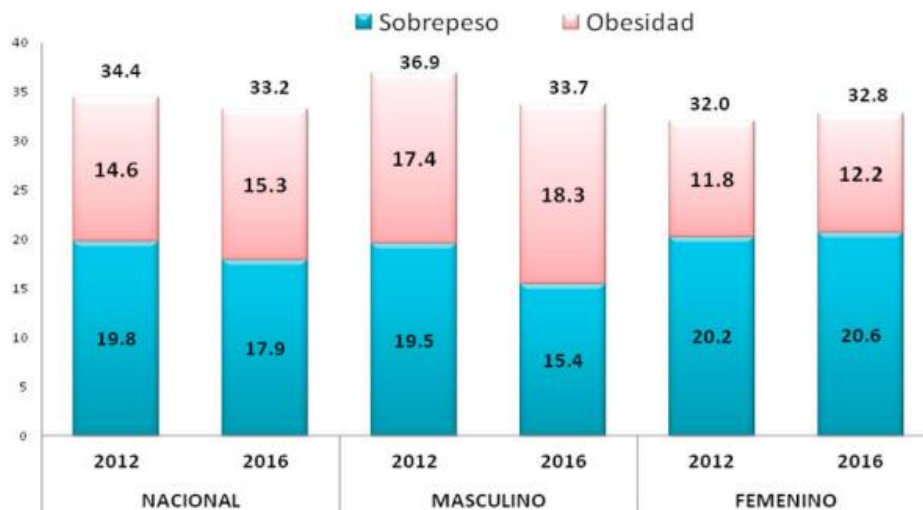
**Figura 1. Prevalencia mundial de obesidad en hombres de 18 años en adelante ( $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ ). En rojo se muestran los países donde el IMC es  $\geq 25$ , en naranja de 15-24.9, en amarillo de 5-14.9 y color crema menor a 5 (Modificado de WHO, 2016).**



**Figura 2 Prevalencia mundial de obesidad en mujeres de 18 años en adelante ( $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ ). En rojo se muestran los países donde el IMC es  $\geq 25$ , en naranja de 15-24.9, en amarillo de 5-14.9 y color crema menor a 5. (Modificado de WHO, 2016)**

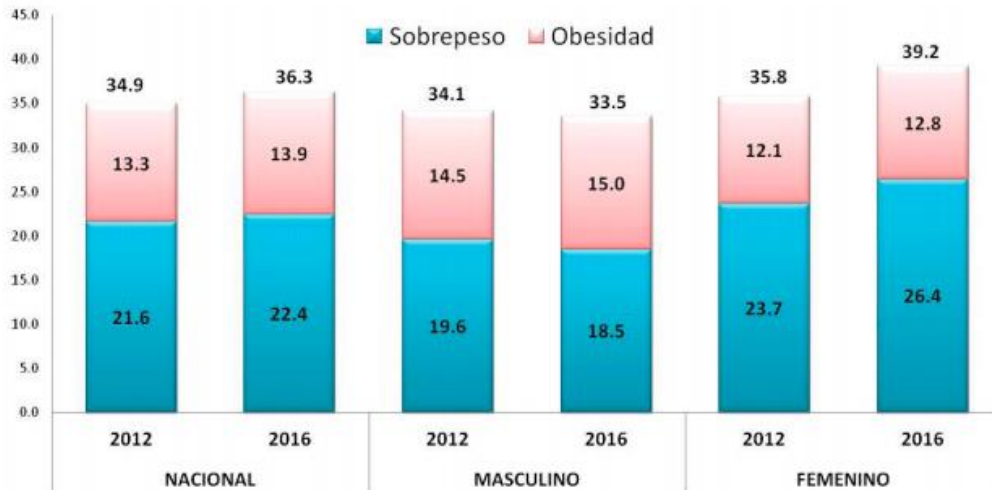
En estudios recientes se ha identificado que la mayoría de las ciudades modernas o industrializadas presentan una prevalencia de sobrepeso y obesidad superior al 50%, y en algunos países, como Estados Unidos, Egipto y Rusia, la obesidad se presentó hasta en el 30% de la población (WHO, 2016). Aunque para el continente americano no se tienen datos disponibles que incluyan a todos los países que lo integran, se sabe que la magnitud

del problema es similar en Canadá, Estados Unidos y México, mientras que países como Brasil tienen una prevalencia de obesidad de tan sólo un 8.3% (Barquera, 2010). En México, el Instituto Nacional de Salud Pública a través de la encuesta nacional de salud pública y nutrición (ENSANUT) publicada en 2016, mostró cifras poco alentadoras, en las cuales las prevalencias de sobrepeso (20.6%) y de obesidad (12.2%) en niñas en 2016 fueron muy similares a las observadas en 2012. En niños se identificó una reducción de sobrepeso entre 2012 (19.5%) y 2016 (15.4%) que resultó estadísticamente significativa; mientras que las diferencias de prevalencia de obesidad en 2012 entre niños (17.4%) y niñas (18.6%) en 2016 no fueron estadísticamente significativas.



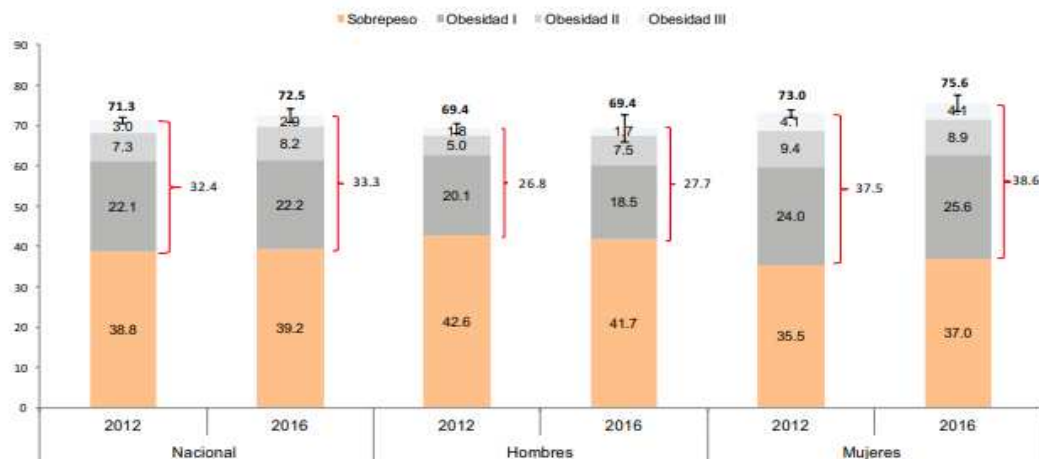
**Figura 3 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo.** Es esta grafica se presenta una comparación entre los resultados de obesidad a nivel nacional, así como para ambos sexos entre 2012 y 2016, obtenidos de la encuesta nacional de salud (Modificado de López, 2016).

En adolescentes de entre 12 y 19 años la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 36.3%, 1.4% superior a la prevalencia en 2012, mientras que la prevalencia en adolescentes de sexo femenino en 2016 fue 2.7% superior a la observada en 2012 (23.7%). Esta diferencia es estadísticamente significativa. En cambio, la prevalencia de obesidad en ambos sexos (12.8%) fue similar a la observada en 2012 (12.1%). En los adolescentes de sexo masculino no se observó diferencia significativa alguna entre 2012 y 2016.



**Figura 4 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo.** Es esta grafica se presenta una comparación entre los resultados de obesidad a nivel nacional, así como para ambos sexos entre 2012 y 2016, obtenidos de la encuesta nacional de salud (Modificado de López, 2016).

En adultos de 20 años y más la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016. El aumento de 1.3% no fue estadísticamente significativo. Las prevalencias tanto de sobrepeso como de obesidad, y de obesidad mórbida fueron más altas en el sexo femenino. Sin embargo, la prevalencia de sobrepeso fue 4.5% más alta en las zonas rurales, mientras que la prevalencia de obesidad fue 5.8% más alta en las zonas urbanas (López, 2016).



**Figura 5 Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años, de la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 por sexo.** Clasificación de IMC descrita por la OMS; sobrepeso = 25-29.9 Kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado I= 30.0-34.9 Kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado II = 35.0-39.9 Kg/m<sup>2</sup>, obesidad grado III ≥ 40.0 Kg/m<sup>2</sup> (Modificado de López, 2016).

### 2.3 Causas de la obesidad

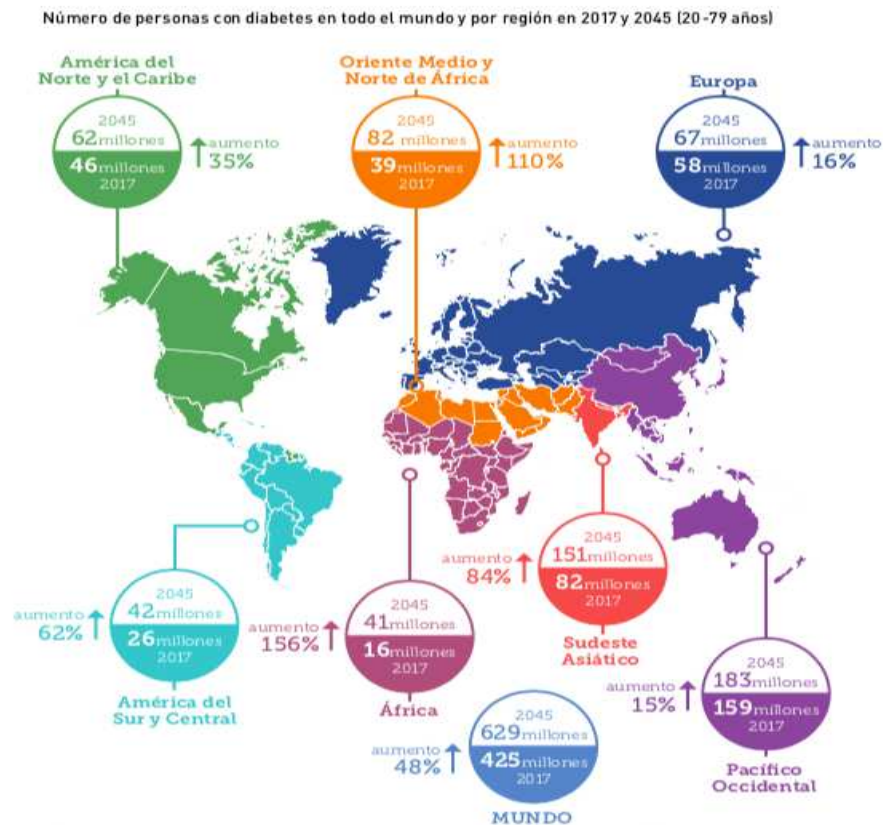
La obesidad y el sobrepeso son enfermedades de etiología multifactorial de curso crónico, en ambas se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida. Se caracteriza por un balance positivo de energía, que ocurre cuando la ingestión de calorías excede al gasto energético, ocasionando un aumento en los depósitos de grasa corporal y en consecuencia la ganancia de peso (Barquera, 2010). En este contexto, de manera simple, la causa fundamental de la obesidad y el sobrepeso es un desequilibrio energético que se asocia a las calorías consumidas y las calorías gastadas (Jivraj, 2016). A nivel mundial, las personas procuran una mayor ingesta de alimentos densos en energía que son altos en grasa o azúcar, así como, un aumento en la inactividad física debido a un estilo de vida cada vez más sedentario (Puhl & Heuer, 2009). Cambios en la dieta y en los patrones de actividad física son a menudo el resultado de la salud ambiental y social, así como cambios asociados al desarrollo y falta de políticas de apoyo en los sectores de salud, agricultura, transporte, planificación urbana, medio ambiente, procesamiento de alimentos, distribución, comercialización y educación (Turnbaugh, Bäckhed, Fulton, & Gordon, 2008).



**Figura 6 Causas de la obesidad.** La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial, en la que un conjunto de padecimientos combinado con factores genéticos y ambientales puede contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

## 2.4 Obesidad como factor de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La obesidad, es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como: DMT2, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (OMS, 2016). Dichas patologías, representan la principal causa de mortalidad en el mundo, así como a Nacional (IMCO, 2015; OMS, 2016). Se estima que cada año fallecen alrededor 3.4 millones de personas adultas a consecuencia de patologías relacionadas con este padecimiento. En particular, los factores etiológicos involucrados en el desarrollo de la diabetes mellitus (DM) son variados y no totalmente conocidos, permitiendo agrupar a gran parte de los casos dentro de dos categorías etiopatogénicas: la DMT1, caracterizada por la deficiencia absoluta de la insulina, de etiología autoinmune; y la DMT2, en la que se combinan la resistencia periférica a la insulina y una respuesta secretoria compensatoria insuficiente (Prieto et al., 2012).



**Figura 7** Número de personas con diabetes en el mundo, así como por región en 2017 y 2045 (20-79 años.) obtenida de Atlas Diabetes de la FID 8va edición 2017. Muestra el número de personas que presentan diabetes por región (verde América de norte, naranja oriente medio, azul marino Europa, celeste

América del sur, morado pacífico occidental, guindo África.) (Modificado de Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas, 2017).

En la actualidad, cerca de 500 millones de personas alrededor del mundo viven con diabetes, de los cuales el 10% de los casos, en el mundo, tiene DMT1, mientras que el 90% restante padece DMT2 (López, 2016), siendo la DMT2 más frecuente en los países de ingresos bajos y medios, ya que presentan casi el 80 % de la prevalencia de diabetes (Figura 7). De interés para el propósito de esta investigación se conoce que la obesidad está estrechamente asociada con el desarrollo de DMT2, sin embargo, las causas metabólicas o moleculares que podrían explicar este vínculo complejo de trastornos es difícil de dilucidar. Algunas de las teorías destacan que los lípidos poseen un potencial tóxico dependiente del tipo de especie y sitio del cuerpo de producción y acumulación. Inicialmente propuesta por Roger Unger (1994), la “lipotoxicidad” es la causante de estados de insulino-resistencia en diversos órganos del cuerpo que dan lugar al desarrollo de complicaciones metabólicas relacionadas con la presencia de DMT2 (Sámano et al., 2013). La explicación a este evento se centra en que el incremento en el flujo de ácidos grasos al torrente sanguíneo e incorporación y metabolismo en el interior de la célula favorece la acumulación de metabolitos lipídicos secundarios que en algunas instancias son de naturaleza tóxica. Por ejemplo, se han identificado que el incremento y acumulación de lípidos genera la formación de las especies diacilglicerol, ceramidas y acilcarnitinas (Muñoz, 2006). En consecuencia la acumulación de estas nuevas especies en órganos no adaptados para su almacenamiento, como el músculo, el hígado, las células  $\beta$  del páncreas, corazón y cerebro, presentan adaptaciones negativas en su metabolismo que dan lugar a su disfunción y contribuyen a la generación de resistencia a la insulina e incremento en la susceptibilidad al desarrollo de la DMT2 (DeFronzo, 2010). Con ello, a continuación, describiremos el papel fisiológico de la insulina en el control de la homeostasis de glucosa en plasma.

## **2.5 Regulación del metabolismo energético: papel de la insulina**

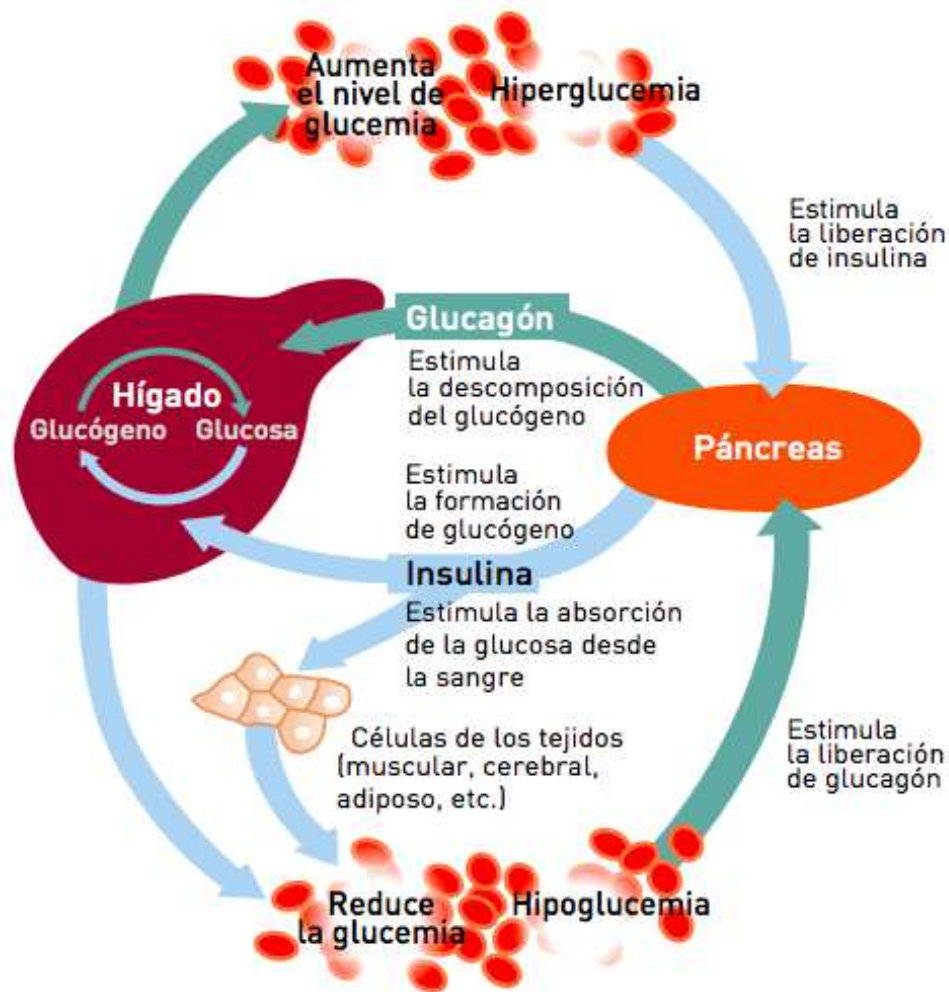
La insulina es una hormona polipeptídica conformada por 51 aminoácidos, que consiste en dos cadenas polipeptídicas, A y B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente,



conectadas por puentes disulfuro. La insulina se produce y es secreta por las células  $\beta$  del páncreas en los islotes de Langerhans, en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre, regulando su homeostasis en plasma y el metabolismo o síntesis de los lípidos (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). Por su parte, la regulación de la glucosa en el organismo también depende de la hormona antagónica a la insulina, el glucagón; secretado por las células  $\alpha$  del páncreas y que se asocia principalmente a incrementar la producción de glucosa en condiciones de demanda energética. Con ello, en el control de la concentración basal de glucosa en la sangre, el glucagón aumenta sus niveles y la insulina los disminuye (Jiang & Zhang, 2003)(figura 8).

Las concentraciones de glucosa en sangre, varían de persona a persona. Sin embargo, se han establecido acuerdos en base a estudios poblacionales donde una concentración de glucosa  $<100$  mg/dL se considera normal, mientras que entre 100-126mg/dL se considera prediabetes, y valores de 126mg/dL se consideran indicativos de diabetes mellitus (DM) (Care, 2017). De manera fisiológica, la homeostasis de glucosa se regula por la acción de la insulina a nivel del músculo estriado, corazón y el tejido adiposo, ejerciendo acciones a través de los receptores GLUT-4 de las células. Por su parte, la insulina también puede estimular el uso de glucosa a través de activación de la fosforilación oxidativa (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). La insulina favorece además el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado, cuya función es mantener las concentraciones de glucosa en sangre, en particular durante las primeras horas de ayuno, aunque una pequeña proporción de glucógeno también puede almacenarse en el músculo como reserva de energía para síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) durante la contracción muscular. Se estima que aproximadamente 400g de glucógeno constituyen del 1%-2% del peso fresco del músculo en reposo y 100g de glucógeno constituyen hasta un 10% del peso fresco en el hígado, pueden encontrarse en un adulto bien alimentado (Harvey & Ferrier, 2011). El glucagón, por el contrario, actúa activando principalmente la glucogenólisis y la gluconeogénesis en conjunto con la hormona cortisol, una alteración en la producción de estas dos hormonas (exceso de glucagón y déficit de insulina) puede generar DM (Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas, 2017). De interés, también se ha identificado el papel de la insulina sobre el sistema nervioso

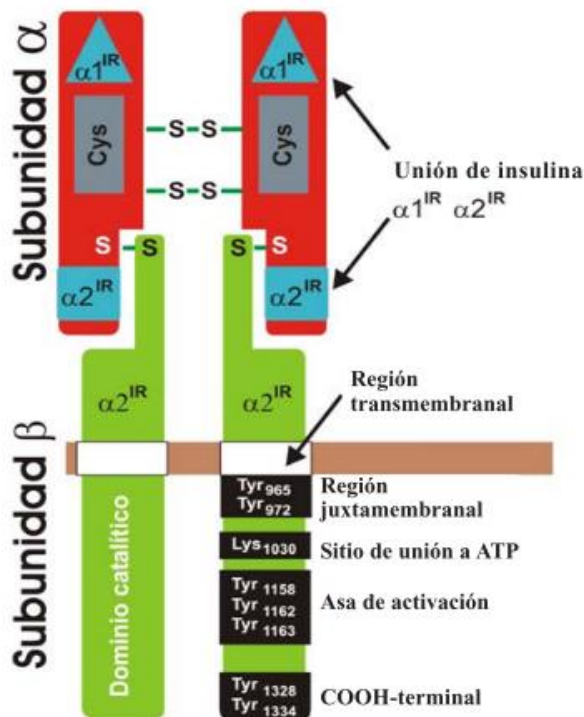
central en la captación de la glucosa. Aunque no totalmente aceptado por la mayoría de los investigadores, se ha reportado que la insulina es capaz de promover la captación de glucosa en células nerviosas en cultivo e incrementaba la entrada de glucosa en el hipocampo y en el hipotálamo de modelos animales (Pons, 2010).



**Figura 8. Regulación de la secreción de insulina.** El control y la regulación de la glucosa en el organismo dependen sustancialmente de la interacción entre las hormonas pancreáticas glucagón e insulina secretadas por las células  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente; sus acciones son antagónicas a nivel del metabolismo energético y son claves para mantener un equilibrio de oferta y demanda, en especial de la glucosa. El glucagón aumenta sus niveles sanguíneos y la insulina los disminuye al ayudar a ingresar esta molécula al interior de las células. La insulina tiene como tejidos efectores principales al músculo estriado, el hígado y el tejido graso, ejerciendo acciones anabolizantes de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno o utilización de esta en la fosforilación oxidativa (Modificado de Bastarrachea, Raúl A. Laviada- Molina, Hugo, Machado-Domínguez, Ldefonso, KentJR, Jack, López-Alvarenga, Juan Carlos, Comuzzie, 2005).

### 2.5.1 Vías de señalización de la insulina

Molecularmente hablando, la insulina se une al receptor de insulina (IR), ubicado en la membrana plasmática. EL IR pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). El IR es un heterotetrámero conformado por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  se encuentran fuera de la membrana celular, sirviendo como sitios de anclaje para la insulina; las subunidades  $\beta$  que encuentran dentro, posee tres sitios de reguladores: una porción extracelular, una trans-membranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de Tyr (Bastarrachea, Raúl A. Laviada- Molina, Hugo, Machado-Domínguez, Ldefonso, KentJR, Jack, López-Alvarenga, Juan Carlos, Comuzzie, 2005). Posterior a la unión de la insulina a las regiones específicas de la subunidad  $\alpha$  del IR, tiene lugar a un inmediato cambio conformacional; lo que ocasiona la autofosforilación de los residuos de tirosina en la región intracelular de las subunidades  $\beta$  (Tyr965, Tyr972, Tyr1158, Tyr1162, Tyr1163, Tyr1328 y Tyr1334). Esto ocurre a través de un mecanismo llamado transfosforilación (Jeremie Boucher, Kleinridders, & Kahn, 2014) (Figura 9). Esta activación y fosforilación de los residuos de tirosina se emplea como sitios de acoplamiento para los efectores del receptor de insulina, que posteriormente transmitirán la señalización molecular intracitosólica mediante dos vías principales de transducción, la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (Jeremie Boucher et al., 2014). Las vías de PI3K y MAP cinasas se encargan de regular la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos hacia el núcleo celular (Lizcano & Alessi, 2002).

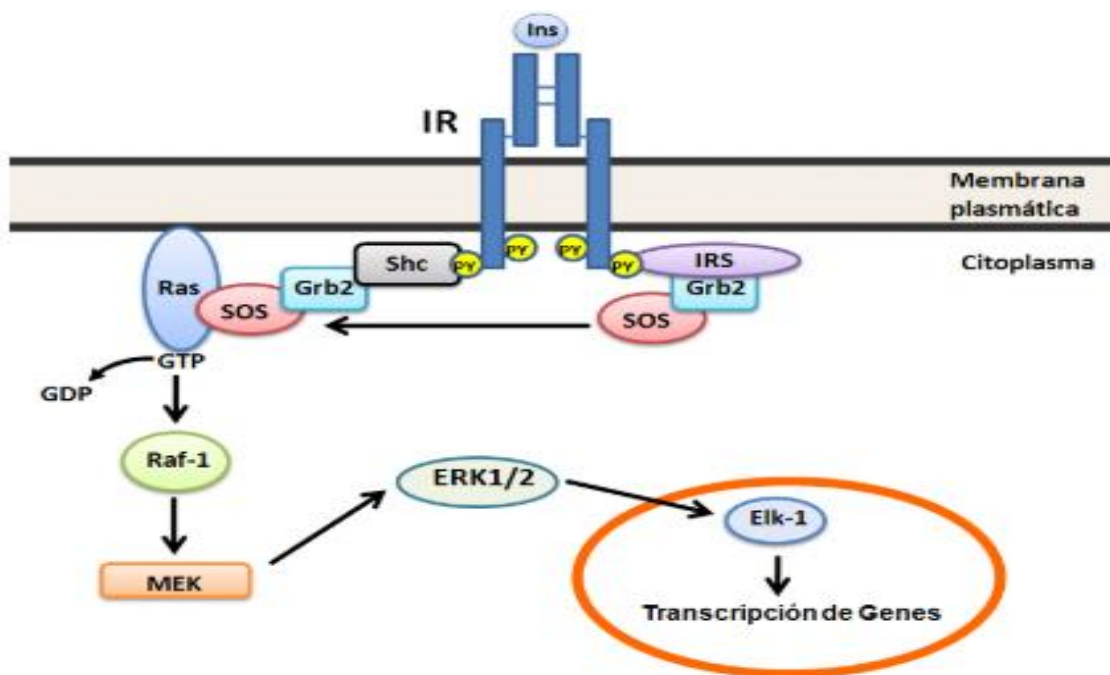


**Figura 9 Estructura del Receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor.** El IR es un heterotetrámero que consiste en dos subunidades: α y β unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina α1<sup>IR</sup> y α2<sup>IR</sup> en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad β contiene una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular. En su porción intracelular donde se localizan los residuos de tirosina, que sirven como sitios de acoplamiento para los efectores de receptor de insulina (Tyr965, Tyr972, Tyr1158, Tyr1162, Tyr1163, Tyr1328 y Tyr1334) (Modificado de Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008).

### 2.5.1.1 Vía de señalización de las MAP cinasas

Mediante la vía de las Map cinasas, se regulan los efectos promotores del crecimiento ejercidos por la acción de la insulina (Chang & Karin, 2001). La activación de esta vía involucra la fosforilación de los residuos Tyr de las proteínas IRS y/o proteína que contiene el dominio SH2, las cuales, a su vez, interactúan con la proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), que recluta al factor recambiador de nucleótidos de guanina “Son of Sevenless” (SOS) a la membrana plasmática para la activación de la proteína G pequeña “Ras”, catalizando el intercambio de difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) en Ras, lo que permite su activación (Avruch, 2001). La activación de MAPKs requiere la fosforilación de los residuos de Thr y Tyr localizados entre los subdominios VII y VIII del núcleo catalítico; su estructura primaria, además de incluir esta región catalítica, posee un dominio CD (de anclaje común o Common Docking) cuya secuencia permite la unión con sus MAPKs activadoras, con fosfatasa que las inactivan o bien, con los sustratos a los que fosforila, siendo todas éstas, interacciones excluyentes entre sí. Las interacciones electrostáticas que se establecen entre

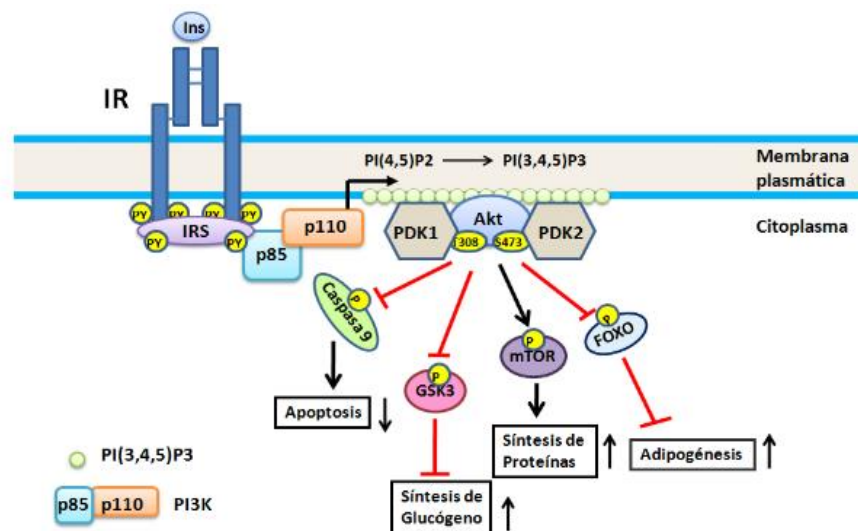
los residuos con carga de los sitios D y CD son fundamentales, pues el dominio CD contiene en su secuencia [LY][LHY]DXX[DE]XX[DE]EPXC residuos ácidos (D y E) e hidrofóbicos (L, H y Y) que interactúan con los residuos básicos (K y R) e hidrofóbicos (LXLXL) de las MAPKKs (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). La mayoría de las MAPKs tienen regiones N- y C-terminales cortas, ya que la mayor parte de su longitud lo ocupa el dominio catalítico que contiene aproximadamente 300 residuos (Saucedo García & Gavilanes Ruíz, 2005). El Ras-GTP opera como un intercambio molecular, estimulando la activación de la cascada de MAPK, a través de la activación secuencial de Raf, MEK y ERK1/224,26. Una vez activas, ERK1/2 se traslocan al núcleo y catalizan la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica y promueven el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Pearson & Cobb, 2002) (Figura 10).



**Figura 10 Mecanismo de señalización desencadenado por las Mapquinas. Al unirse la inulina a su receptor en la membrana celular este sufre un cambio conformacional exponiendo los residuos de tirosina de la subunidad B (), sirviendo como sitios de anclaje para Shc E IRS, lo cual permite la unión de proteínas como Grb2 y SOS; Ras se une a SOS, activando a RAF-1 y posteriormente a MEK-1, permitiendo la fosforilación y activación de ERK 1/2 , se traslada al núcleo sirviendo como factor de transcripción (Modificada de Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008).**

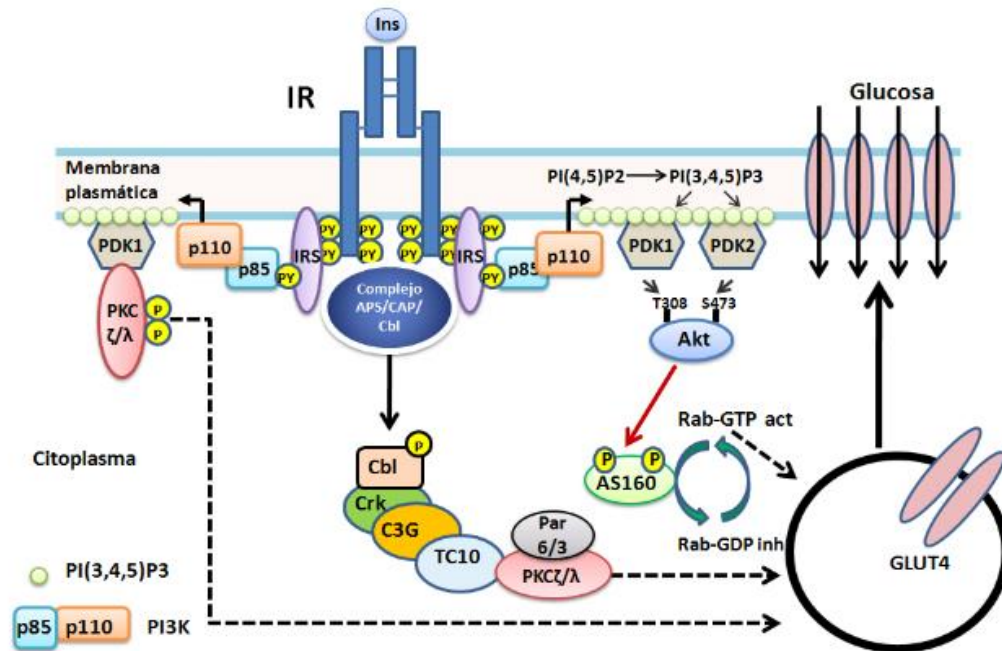
### 2.5.1.2 Vía de señalización de PI3K

La vía de señalización involucra la activación de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) asociada al crecimiento y la supervivencia celular (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2009). La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina kinasa, los cuales autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste último, a la vez, fosforilara la subunidad p85 de la PI3K. La fosforilación de la subunidad p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína Akt (Pinzón et al., 2009)(Figura 11). La activación de la Akt tiene múltiples blancos moleculares que son de suma importancia en la regulación de la homeostasis de glucosa en plasma. Su activación permite la disminución de adipogénesis, inhibe la síntesis de glucógeno y la apoptosis, fomenta la síntesis de proteínas; y de sumo interés, estimula las translocación de los receptores GLUT-4 a la membrana plasmática, permitiendo la captación de glucosa por la células insulino dependientes (Figura 11 y 12) (Zamora, Chávez, & Méndez, 2004). La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica, así como una inhibición en la propia vía de señalización provocando la resistencia a la insulina.



**Figura 11 Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina.** Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa. Al unirse la insulina a su receptor

en la superficie de la célula, mediante una cadena de señalización dependiente de fosforilación de produce la activación de AKT/PKB (es fosforilada en dos residuos específicos “ser 473 y Thr 308”), la cual actúa directamente inhibiendo la apoptosis, síntesis de glucógeno y adipogénesis; por otra parte, favorece la síntesis de proteínas e internalización de la glucosa a la célula (*Modificado de Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008*).

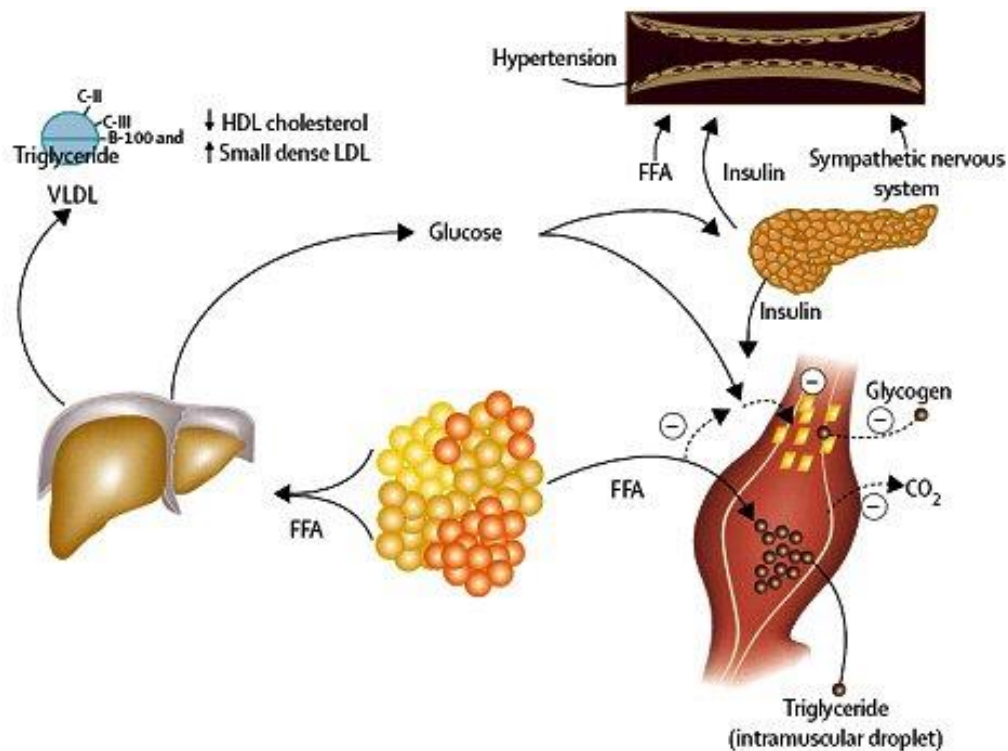


**Figura 12 Regulación del transporte de glucosa por la insulina. La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática.** Las acciones de la insulina son altamente reguladas para promover el adecuado funcionamiento de sus acciones metabólicas, promotoras del crecimiento y la proliferación celular. La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. AS160 estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) e inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando AS160 es fosforilada por Akt se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT4 a la membrana plasmática. Por otra parte, PDK1 induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la PKC (PKC $\lambda/\xi$ ), que contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina. Recientemente se describió un modelo alternativo independiente de PI3K/PDK1/Akt, mediante el cual la unión de insulina a su receptor activa la proteína G pequeña TC10 vía el complejo APS/CAP/Cbl. TC10 participa en la activación de las PKC- $\lambda/\xi$  que produce la translocación de GLUT4 (*Modificado de Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008*).

## 2.6 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina, se define como una menor eficiencia biológica por parte de la insulina al actuar sobre sus órganos blanco (Pajuelo & Pando, 2006). La resistencia a la insulina es un estado patológico en el cual se presenta el decremento o

ausencia de respuesta de las células a la insulina que conlleva al incremento de los niveles basales de glucosa en sangre. Como es de esperarse, este efecto negativo favorece el desarrollo de DM2, además estar asociado frecuentemente a diversas patologías como: enfermedades cardiovasculares, hipertensión, dislipidemias, hepatopatías, hipercolesterolemia, cáncer, síndrome metabólico, entre otros (Nakatani et al., 2005). De manera general, la resistencia a la insulina disminuye el transporte de glucosa inducido en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático, que en su conjunto incrementan aún más las concentraciones de glucosa en la sangre (Samuel & Shulman, 2012) (Figura 13).



**Figura 13 Relaciones intercelulares dadas en la resistencia a la insulina.** Durante la resistencia a la insulina se disminuye la capacidad de los tejidos efectores, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo, de responder adecuadamente a las concentraciones normales (o elevadas) de insulina circulantes. Favoreciendo la acumulación de grasa en estos tejidos (Modificado de Pascoe et al., 2012).

A nivel molecular, los mecanismos por los que se genera la resistencia a la insulina pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la consecuencia de una deficiente señalización de la insulina causada por mutaciones o modificaciones post-traduccionales del IR o de moléculas efectoras río abajo del mismo



(Ye, 2013). En algunos casos la resistencia a la insulina se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más a menudo se atribuye a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de proteínas localizadas río abajo del mismo y que desempeñan funciones importantes en la señalización de la insulina (Kang, Tsai, & Rosen, 2016). Entre las alteraciones más comunes, destacan: la disminución en el número de receptores de insulina, hiperfosforilación de los residuos tyr en las subunidades reguladoras, una marcada disminución en la actividad de las cinasas PI3K o Map cinasas induciendo el decremento de la translocación de los receptores GLUT-4, a la membrana plasmática, esto es debido a que se observa un decremento en la activación de la proteína AKT/PKB, ya que se inhibe la fosforilación en dos de los residuos específicos: SER473 y THR 308. Estos eventos favorecen la apoptosis, síntesis de glucosa y acumulación de lípidos intracelulares (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). En estas condiciones, el cuerpo responde aumentando los niveles de insulina generando hiperinsulinemia en sangre. Si este estado continúa crónicamente se presenta un fallo en las células B del páncreas y se favorece activamente el desarrollo de DMT2 (DMT2) (Care, 2017).

## **2.7 Efectos subcelulares por acumulación de lípidos en el desarrollo de resistencia a la insulina**

### **2.7.1 La lipotoxicidad es un mecanismo patogénico que genera daño metabólico en órganos claves para el desarrollo de DMT2**

El desarrollo de obesidad requiere de un estado de balance energético positivo, principalmente relacionado con el incremento del tejido adiposo. Sin embargo, aún no está del todo claro por qué la expansión del tejido adiposo en personas con obesidad está fuertemente asociada con la generación de resistencia a la insulina y DMT2. Una de las hipótesis que trata de explicar este vínculo difícil de entender, propone que durante la obesidad se altera la capacidad de expansión y función del tejido adiposo promoviendo el flujo de ácidos grasos de los adipocitos y su acumulación en el plasma incrementando la susceptibilidad al deterioro metabólico (Carobbio, Rodriguez-Cuenca, & Vidal-Puig, 2011).

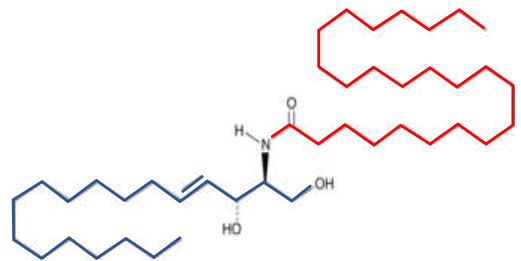
En este contexto, las alteraciones en el perfil de lípidos en el plasma de humanos con obesidad pueden reproducirse en modelos animales con obesidad genética (*ob/ob*) u obesidad inducida por una dieta alta en grasa. El uso de estos modelos animales ha sugerido que el escape de los lípidos del tejido adiposo y la acumulación ectópica de los mismos genera daño tisular en órganos metabólicamente relevantes, incluyendo, el músculo esquelético, el hígado, las células  $\beta$  del páncreas, el miocardio y el cerebro, un evento que se le ha denominado lipotoxicidad (Carobbio et al., 2011). La lipotoxicidad se asocia a la activación de estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial e inflamación en tejidos implicados en la homeostasis metabólica, incluyendo las células  $\beta$  pancreáticas, el músculo esquelético y cardiaco. La afección en estos sistemas puede inducir la generación de resistencia a la insulina y el desarrollo de DMT2 (Cnop, Foufelle, & Velloso, 2012). Quizá, el mejor ejemplo del daño lipotóxico tisular asociado al incremento en los niveles de lípidos en sangre provenga de los sujetos que presentan lipodistrofia, los cuales son incapaces de formar tejido adiposo y por lo tanto no pueden almacenar lípidos en este órgano, promoviendo la fuga de estos y su acumulación en órganos periféricos. El incremento de lípidos en la sangre de los lipodistróficos correlaciona con la presencia de cardiomiopatía, hígado graso, resistencia a la insulina, etc. Estas características están presentes en sujetos que muestran síndrome metabólico y diabetes (Vidal-Puig & Carmena Rodríguez, 2014). De interés, la lipotoxicidad también puede ocurrir en el SNC, tal y como se ha observado en diversas enfermedades neurodegenerativas (Eizirik, Cardozo, & Cnop, 2008). En su conjunto, defectos en el almacenaje de lípidos en el tejido adiposo dan lugar a la fuga y acumulación ectópica en órganos metabólicamente relevantes en el control de energía, favoreciendo el desarrollo de daño tisular y generando obesidad y DMT2. Consideramos que el SNC puede ser un blanco para mostrar daño celular inducido por lipotoxicidad en el contexto de obesidad o incremento de ingesta calórica. Sin embargo, también es importante mencionar que el grado de daño lipotóxico es dependiente de la especie de lípido acumulada en el sistema, lo cual describiremos a continuación.

### 2.7.2 Generación de lípidos lipotóxicos: Síntesis de ceramidas

Algunas de las especies de lípidos que tienen un alto potencial para ejercer daño lipotóxico a los tejidos son las ceramidas, acilcarnitinas, diacilgliceroles y los ácidos grasos saturados (Carobbio et al., 2011). Las ceramidas pertenecen al grupo de los esfingolípidos, el cuál es controlado por una red compleja de vías interconectadas que llevan a la producción de moléculas bioactivas (Aláiz, 2009). La ceramida es la molécula principal en el metabolismo de esfingolípidos y representa un precursor común a muchas otras especies. Su producción puede ser mediada por la síntesis *de novo* por la enzima palmitoil transferasa (SPT) y la ceramida sintasa (CerS) o la hidrólisis de la esfingomielinea de la membrana por la enzima esfingomielinasa (Aláiz, 2009).

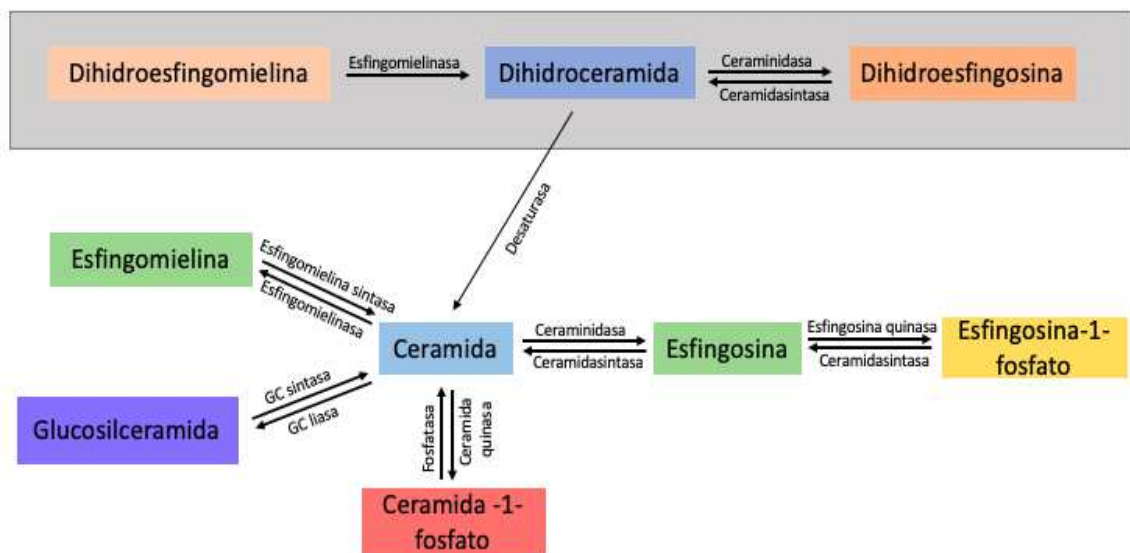
La síntesis de esfingolípidos *de novo* comienza con la condensación de la serina y la palmitoil-coenzima A por la acción de la enzima SPT para formar 3-cetodihidroesfingosina (Hannun & Obeid, 2008). Esta enzima, que se localiza en el retículo endoplásmico (RE), existe como un multímero de 480kDa compuesto por un conjunto de 4 dímeros; las reacciones siguientes son catalizadas por la 3-cetoesfingosina reductasa, las ceramida sintasas y las

dihidroceramidas desaturasas (Hannun & Obeid, 2008). Las ceramidas, también conocidas químicamente como N-ácil-esfingosinas, son precursores bioactivos que actúan como puntos metabólicos centrales en

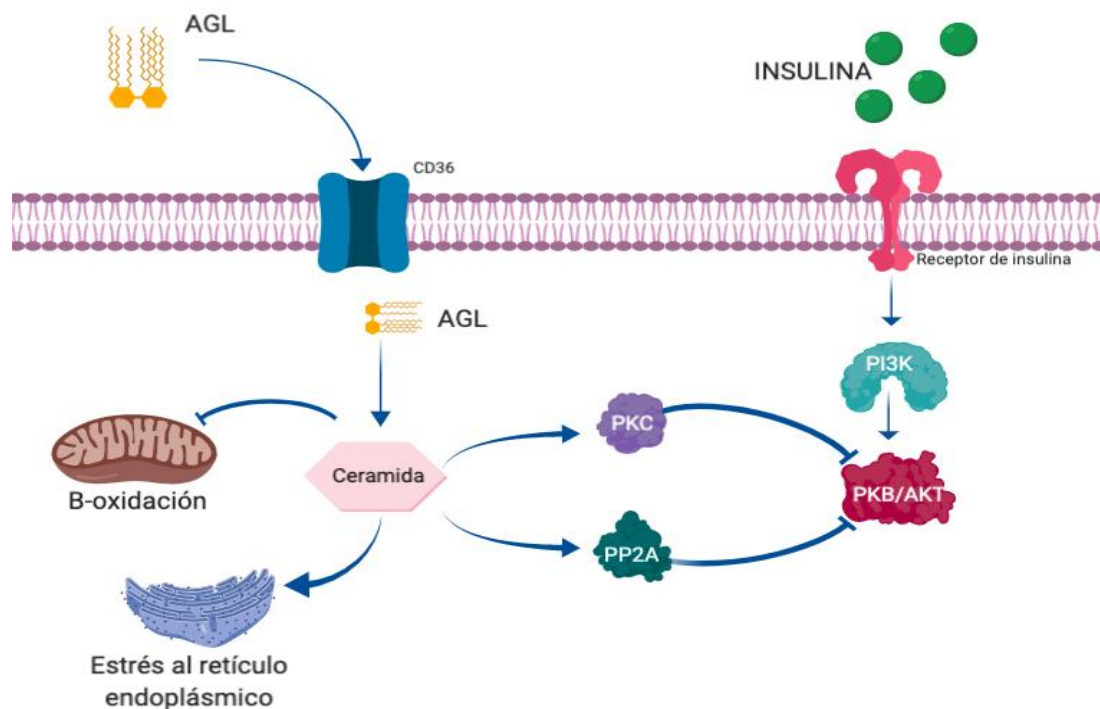


la biosíntesis y la descomposición de los esfingolípidos (Broskey, Obanda, Burton, Cefalu, & Ravussin, 2018). Estructuralmente las ceramidas, están conformadas por una esfingosina unida a un ácido graso de cadena variable, a través de un enlace tipo amida (Hannun & Obeid, 2008). Las ceramidas pueden obtenerse de diferentes vías, destacando principalmente la síntesis *de novo*, así como la hidrólisis de la esfingomielinea. Aunque las ceramidas prevalecen en la dieta, éstas tienden a degradarse en gran medida en el intestino (Duan & Nilsson, 2009). Su producción en diversos tejidos está impulsada por una vía *de*

*síntesis de novo* ceramida conservada que comienza en el retículo endoplásmico con la condensación de palmitoil-CoA y serina, con la intervención de la enzima serina palmitoiltransferasa (*Spt 1-3*), para producir 3-cetoesfingánina; este el punto limitante de la reacción (Aláiz, 2009). A continuación, se presentan tres reacciones: la 3-cetoesfingánina reductasa (*3Ksn*) genera esfingosina, que luego es *n*-acilada por la dihidroceramida sintasa (*Cers 1-6*), para producir dihidroceramida, la cual es un metabolito secundario fisiológicamente afuncional. Luego, las desaturasas (*Des1 y 2*) introducen un doble enlace distintivo en dihidroceramida para producir ceramidas (Aláiz, 2009). La gran diversidad en la familia de los esfingolípidos proviene de una familia de ceraminidasas (*Cers1 - 6*), que agregan ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena al esqueleto esfingoide, lo que lleva a la última generación de ceramida con longitudes de cadena de acilo variables que van desde 14 hasta 34 átomos de carbono (Mao & Obeid, 2008)(figura 14).



**Figura 14 Metabolismo de esfingolípidos e interconexión de esfingolípidos bioactivos. Formación de esfingolípidos bioactivos en células de mamíferos.** La ceramida se puede producir por degradación de la esfingomielina (SM) por la actividad de la esfingomielinasa (SMasa), o por síntesis *de novo* a través de la acción concertada de la serina palmitoiltransferasa y ceramida sintasa. También se puede generar a través del metabolismo de esfingolípidos más complejos. La ceramida también se puede metabolizar a ceramida-1-fosfato mediante la ceramida quinasa. La reacción inversa es catalizada por ceramida-1-fosfato fosfatasa, o por fosfatasas lipídicas. Alternativamente, la ceramida puede degradarse por ceramidasa para formar esfingosina, que a su vez puede ser fosforilada a esfingosina-1-fosfato por la esfingosina quinasa. La reacción inversa es catalizada por fosfatasas de esfingosina-1-fosfato o fosfatasas de fosfato lipídico. La esfingosina-1-fosfato liasa (S1P liasa) descompone la esfingosina-1-fosfato en hexadecenal 2-trans y fosfoetanolamina (Modificado de Hannun & Obeid, 2008).



**Figura 15 Ceramidas y Disfunción Metabólica.** La ceramida provoca disfunción metabólica por varios mecanismos. Inhibe AKT / PKB a través de los intermediarios PP2A y PKCz. Las ceramidas también inducen estrés ER, inhiben la oxidación b mitocondrial y activan el inflammasoma NLRP3 (Modificado de Hernandez, Teruel, & Lorenzo, 2002).

## 2.8 Ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados: Especies de lípidos clave en el desarrollo de daño lipotóxico tisular asociado a la generación de diabetes

Se conoce que la generación y acumulación de ceramidas en las células y tejidos afecta el ciclo celular, diferenciación, apoptosis, entre otras actividades biológicas (Chaurasia & Summers, 2015) (Figura 15). Las especies de ceramidas se suelen dividir con base en longitud de su cadena (formada por un ácidos graso de cadena variable), en corta y de cadena larga, siendo ambas especies de ceramida tóxicas para las células, sin embargo, se ha tomado mayor interés por las especies de ceramida cadena larga, en especial las ceramidas: C16:0, C18:0, C18:1, C22:0, C24:0 y C24:1 (Masukawa et al., 2008). En este contexto se sabe que las ceramidas de especie C18:0 son esenciales para el desarrollo cerebral, mientras que las ceramidas c22:0 y c24:0 modulan la función hepática.

Las ceramidas difieren en su grado de toxicidad. Por ejemplo, la incubación de las células  $\beta$  del páncreas con ácidos grasos saturados de cadena larga y ceramidas, inducen la apoptosis de sus células favoreciendo el desarrollo de diabetes (Cardenas-Perez et al., 2018). En trabajos previos, nuestro laboratorio ha identificado el perfil lipídico en modelos de obesidad y su contribución a la disfunción neuronal (Camacho et al., 2013). En esos estudios se ha propuesto que los lípidos difieren en su grado de toxicidad, exponiendo que ciertas especies como las ceramidas, diacilgliceroles y lípidos saturados promueven efectos más tóxicos que los triacilglicéridos. Por ejemplo, se conoce que la incubación de los islotes  $\beta$  del páncreas con ácidos grasos saturados de cadena larga y ceramidas, inducen la apoptosis de sus células favoreciendo el desarrollo de DM (Unger & Scherer, 2010). Por su parte, en humanos con sobrepeso y obesidad se ha demostrado la acumulación de ceramidas (C:20 y C:22) y de ácidos grasos saturados de cadena larga en el músculo esquelético lo que correlaciona con la presencia de DM (de la Maza et al., 2015). De hecho, biopsias de hígado de mexicanos con obesidad diagnosticados con enfermedad hepática presentan acumulación de triacilglicéridos (León-Mimila et al., 2015). Asimismo, se ha reportado un incremento del 76% y 83% en las ceramidas C16:0 (1 vs 4  $\mu$ M) y C20:0 (0.1 vs 0.65  $\mu$ M) en el músculo de sujetos con obesidad cuando se compara con humanos delgados, respectivamente (Adams et al., 2004). También se ha reportado que hay un incremento en ceramidas en el plasma de personas con hepatoesteatosis no relacionada con el alcohol (Anjani et al., 2015). Algunos reportes han asociado a las especies C:24 con resistencia a insulina y DM (Kasumov et al., 2015). De esta forma, la evidencia demuestra claramente el papel selectivo de especies de lípidos específicas en el desarrollo de toxicidad. La cual es dependiente intrínsecamente del tejido seleccionado. Una de las probables razones de este efecto se debe a que la acumulación de triacilglicéridos en los órganos genera nuevas especies de metabolitos que llegan a ser tóxicas, incluyendo, acilcarnitinas, ácidos grasos saturados de cadena larga, ceramidas, y/o diacilgliceroles (Holland & Summers, 2008).

Las alteraciones en el perfil de lípidos identificadas en el plasma de humanos con obesidad pueden reproducirse en modelos animales con obesidad genética (*ob/ob*) u obesidad inducida por la ingesta de dieta alta en grasa. Los datos demuestran que las

personas con obesidad exhiben un incremento del 86% en los niveles plasmáticos de ceramida C18:0, y en menor grado, el incremento específico de triglicéridos que incluyen la 16:0/16:0/18:1 y 16:0/18:1/18:0 (Kotronen et al., 2009). Por otro lado, en músculo de pacientes, la resistencia a insulina fue caracterizada por altos niveles de esfingolípidos C18:0 y en plasma, los diacilglicéridos y ésteres de colesterol (Tonks et al., 2016). Además, análisis cuantitativos tanto en ratones con HFD o en humanos con DMT2, han determinado que las dihidroceramidas podrían ser biomarcadores de DMT2 (Wigger et al., 2017).

Además, en modelos animales de obesidad genética evidenciaron un incremento del 40% en los niveles de triacilglicéridos (valores de 18 mM) y un 25% en ácidos grasos saturados de cadena larga (valores 1  $\mu$ M) (Ussher et al., 2010). Por otro lado, la dieta alta en grasa en ratones generó un incremento plasmático de 284% en ceramida C20 (valores de 0.026  $\mu$ M), y de C14, C16, C18 (valores de 0.26, 0.08, 0.04  $\mu$ M, respectivamente). En este mismo modelo, se observó un incremento del 100% en los niveles de triglicéridos (valores 20 mM), ácidos grasos de cadena larga (valores de 5  $\mu$ M), ceramidas (valores 140  $\mu$ M), y diacilglicerol (600  $\mu$ M) en el músculo (Shah et al., 2008). Además, la acumulación del lípido saturado, ácido palmítico, en el corazón de ratones transgénicos generó apoptosis de los cardiomiocitos y muerte prematura (Lee et al., 2004). Finalmente, la acción lipotóxica también puede reproducirse en cultivo de células, por ejemplo, la incubación de células de músculo y miocitos de humano con acilcarnitinas o con el lípido saturado palmítico, decrece la sensibilidad a insulina y la captura de glucosa (Aguer et al., 2015). En su conjunto, la obesidad en humanos y en modelos animales con obesidad genética o por dieta, demuestran que el incremento en los niveles de triacilglicéridos, ceramidas y ácidos grasos saturados en plasma correlaciona con defectos de la homeostasis energética y susceptibilidad a la muerte celular.

## **2.9 La lipotoxicidad favorece la activación de estrés al retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico es un organelo celular, encargado de la biosíntesis de lípidos, así como de la biosíntesis de proteínas, plegamiento, modificación y empaquetamiento de éstas. Bajo condiciones fisiológicas como patológicas se sabe que

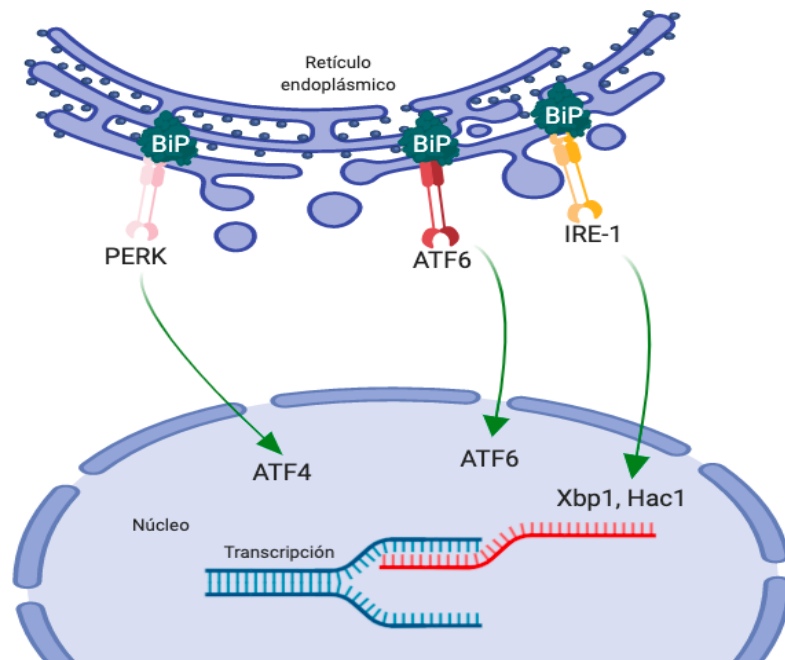
las células incrementan la demanda de proteínas, causando en algunas circunstancias un mal plegamiento de las proteínas. Para asistir al buen plegamiento de proteínas se activa la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR), cuya finalidad es asistir al plegamiento correcto de las proteínas y recuperar la homeostasis celular. Sin embargo, al aumentar la cantidad de proteínas mal plegadas, el retículo endoplásmico favorece la activación de estrés mediante la acción de tres ejes principales que puede censarse por un selecto grupo de proteínas de membrana llamados: IRE, PERK y ATF6.

- IRE: es un sensor transmembrana del retículo endoplásmico (ER) que activa la respuesta de la proteína desplegada (UPR) a través de un dominio de quinasa citoplásmica y un dominio de RNasa para mantener la función celular y de RE. En el estrés de ER, la RNasa de IRE1 se activa a través del cambio conformacional, la autofosforilación y la oligomerización de orden superior. El dominio endoribonucleasa activo empalma el ARNm de XBP1 para generar un nuevo extremo C, convirtiéndolo en un potente activador transcripcional de respuesta de proteína desplegada y activando la detención del crecimiento y la apoptosis (Calton et al., 2002).
- PERK: es también una proteína serina/treonina quinasa que sufre transfosforilación en respuesta al estrés del retículo endoplásmico; PERK activado fosforila la subunidad  $\alpha$  de la iniciación de la traducción factor 2 (eIF2 $\alpha$ ), que resulta en la inhibición de la traducción e iniciación (Bertolotti, Zhang, Hendershot, Harding, & Ron, 2000).
- ATF6: se traslada del RE al aparato de Golgi, donde se procesa a su forma activa regulado por el estrés del retículo endoplásmico (RE) que activa la transcripción de las chaperonas moleculares del retículo endoplásmico (Nakatani et al., 2005).

De interés, se tiene evidencia que en el contexto de obesidad durante el incremento de flujo de ácidos grasos a la célula se produce aumento en la síntesis de ceramidas, entre ellas la especie C24:0, quien se acumula en el retículo endoplásmico desencadenando la UPR (Han & Kaufman, 2016). Por su parte, nuestro laboratorio ha demostrado que la incubación con ácido palmítico en neuronas en cultivo favorece la activación del RE, e



induciendo un aumento en la expresión de la proteína BIP (Días Salinas, 2015). Así mismo se sabe que existe el potencial de producir estrés del RE por parte de las ceramidas en adipocitos, músculo esquelético, miocitos, hepatocitos y neuronas hipotalámicas, exacerbando así la UPR (Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016). Por otra parte, empleando modelos animales de obesidad genética (ratón ob/ob) se ha identificado una sobreexpresión de los marcadores de estrés del RE; como la HSPA5, PERK fosforilado y eIF2a fosforilado, tanto en el hígado como tejido adiposo (Burton & Hilton, 2016). Además, la obesidad inducida por la ingesta de dietas altas en grasa o de obesidad genética en ratas y ratones, promueve el incremento de ceramidas, diacilglicerol, colesterol, induciendo estrés en el RE, así como resistencia a la insulina (Bolado et al., 2006). De hecho, la incubación con el lípido saturado, ácido palmítico -un ácido graso saturado-, en neuronas de hipotálamo, promueve estrés del RE y apoptosis, atenuando la señal de insulina (Mayer & Belsham, 2010). Así mismo, el tratamiento con de la ceramida C6 en ratones, incrementó la concentración de ceramida C16 en el medio basal hipotálamo (MBH) y aumento del estrés en el RE (Contreras et al., 2014).

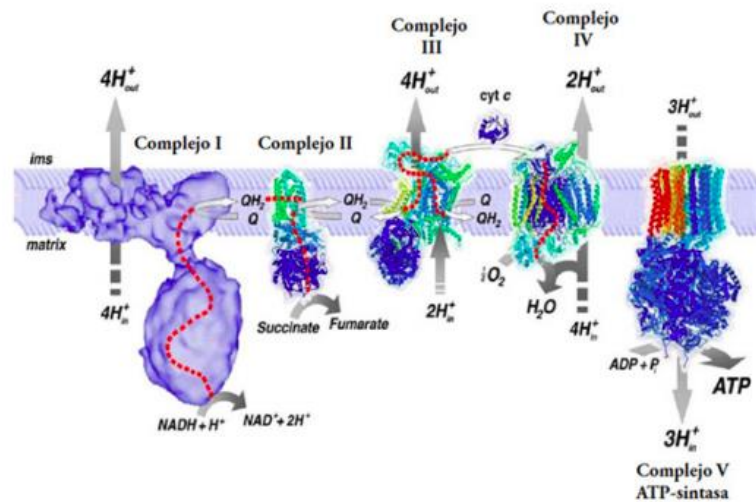


**Figura 16** Mecanismo de activación sobre el estrés al retículo endoplásmico. Diferentes procesos ambientales, fisiológicos y patológicos causan estrés al retículo endoplásmico, activando la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) La UPR está señalizada por tres proteínas unidas a la membrana del RE, PERK, IRE1 $\alpha$  y ATF6 $\alpha$  para resolver la homeostasis del ER a través de los cambios de traducción y transcripción en respuesta al estrés

del ER. PERK fosforila el eIF2 $\alpha$  para atenuar la síntesis de proteínas, que activa de manera preferencial la traducción del ARNm de ATF4 para inducir sus genes diana, CHOP y GADD34. El IRE1 $\alpha$  activado escinde el ARNm de XBP1 para producir una forma de empalme que traduce un nuevo polipéptido, XBP1, para regular al alza los genes involucrados en la biogénesis de la membrana del RE, el plegamiento y el tráfico del ER y el ERAD. (Modificado de Cárdenas-Pérez & Camacho, 2016)

## **2.10 La lipotoxicidad favorece la activación de disfunción mitocondrial**

La mitocondria representa a uno de los organelos más importantes para la función celular, ya que se encarga de la producción de energía (ATP), así como del proceso de la muerte celular programada (apoptosis), actuando como reservorio de proteínas apoptóticas como: el citocromo C, Smac / Diablo, el factor inductor de apoptosis, (AIF, por sus siglas en inglés), endonucleasa G y las procaspasas (Sánchez & Arboleda, 2008). Las mitocondrias están compuestas por un sistema de doble membrana una externa y otra interna, que separan tres espacios muy definidos: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Freya & Mannellab, 2000). La mitocondria emplea el oxígeno para oxidar diversos sustratos metabólicos necesarios para la producción de ATP mediante el acoplamiento de la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones (Miles, 2003). Además, la cadena respiratoria mitocondrial está localizada en la membrana interna donde se lleva a cabo la producción de ATP que requiere dos importantes pasos: 1) oxidación de NADH o FADH<sub>2</sub> (provenientes de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico, además de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos) y 2) fosforilación de ADP para formar ATP. De esta manera, los electrones provenientes de los sustratos oxidados son transferidos al oxígeno, por una serie de reacciones de oxidación-reducción en donde el producto químico final es el agua. En este proceso, los protones son bombeados desde la matriz mitocondrial para cruzar la membrana mitocondrial interna, por medio de los complejos respiratorios (I, III y IV) que componen la cadena de fosforilación oxidativa (Jastroch, Divakaruni, Mookerjee, Treberg, & Brand, 2010)(Figura 17).



**Figura 17 Cadena de transporte de electrones. Componentes de la fosforilación oxidativa.** Los complejos respiratorios I y II oxidan sustratos provenientes del ciclo de Krebs (Figura 4) como lo son el NADH y el succinato, para generar una corriente de electrones a lo largo de la membrana que culmina en el consumo de oxígeno por el complejo IV y la formación de agua. Durante la respiración, los complejos I, III y IV bombean protones a través de la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembranal, los cuales son transportados de regreso a la matriz mitocondrial por la ATP sintasa (o complejo V). Este flujo de protones es lo que impulsa la síntesis del ATP durante la fosforilación oxidativa de acuerdo con la teoría quimiosmótica de Peter Mitchell (Modificado de Jastroch et al., 2010).

Adicionalmente, la mitocondria realiza procesos de fusión y fisión mitocondrial en un evento fisiológico conocido como dinámica mitocondrial. Durante la fusión y fisión mitocondrial participan cuatro GTPasas: Mitofusina 1 y 2, Opa1 y Drp1; las cuales llevan a cabo su función determinada mediante la hidrólisis del GTP (Martorell, 2014). El proceso de fusión mitocondrial induce que los orgánulos se mantengan homogéneamente y facilita la seguridad del ADN mitocondrial. En dicho proceso las proteínas con mayor función son las mitofusinas 1 y 2; las cuales se expresan en todos los tejidos pero los niveles se ven aumentados en corazón, hígado y cerebro (Hewitt & Whitworth, 2017). En los últimos años se ha demostrado que la disfunción mitocondrial se asocia a la generación de resistencia ala insulina, obesidad y diabetes (Pajuelo & Pando, 2006). En particular se conoce que los ácidos grasos pueden inducir cambios en la actividad mitocondrial, lo cual puede producir disfunción mitocondrial (Sharma et al., 2013). Como ejemplo, se ha reportado que ratones expuestos a dietas altas en grasa por 5 días reducen la síntesis de ATP y la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa y la biogénesis

mitocondrial, como: NADH: : Ubiquinona, subunidad B3 de la oxidoreductasa (NDUFB3), NADH: ubiquinona subunidad B5 de la oxidoreductasa (NDUFB5), NADH:ubiquinona subunidad S1 de la oxidoreductasa (NDUFS1) y NADH:ubiquinona subunidad VI de la oxidoreductasa (NDUFV1); succinato deshidrogenasa subunidad B (SDHB) en el complejo II y una proteína portadora mitocondrial *Solute Carrier Family 25 Member 12* (SLC25A12) (Minet & Gaster, 2010; Sparks et al., 2005). De la misma manera, el aumento en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y aumento de especies reactivas del oxígeno afectan el balance redox en la célula desencadenando la resistencia a la insulina (Jérémie Boucher, Kleinridders, & Ronald Kahn, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que los lípidos saturados disminuyen la mitofusina 2. Lo que lleva a la activación del estrés del retículo endoplásmico y la resistencia a la insulina en células hipotalámicas. Nosotros encontramos que la estimulación lipotóxica inducida por el ácido palmítico, pero no el ácido palmítoleico monoinsaturado, disminuye los niveles de proteína MTF2 en las células mHypoA-CLU192 hipotalámicas (Diaz et al., 2015). Además, la incubación con ácido palmítico -saturado-activa la respuesta al estrés del RE, evidenciada por el aumento en los niveles de proteína del marcador GRP78 / BIP en una etapa posterior a la regulación por disminución de MTF2. Además, encontramos que las alteraciones de MTF2 inducidas por la estimulación con palmítico, pero no con ácido palmítoleico, exacerbaban la resistencia a la insulina en las células hipotalámicas. (Diaz et al., 2015). Por otra parte, se sabe que, en el hígado la obesidad conduce a una reorganización marcada de MAM's que produce sobrecarga de calcio mitocondrial, capacidad oxidativa mitocondrial comprometida y estrés oxidativo aumentado. La inducción experimental de las interacciones RE-mitocondria produce estrés oxidativo y homeostasis metabólica dañada, mientras que PACS-2 o IP3R1 producen una regulación negativa. Además, la resistencia a insulina en humanos también se asocia a una reducción en la expresión genética mitocondrial, así como al decremento en la expresión de proteínas de los complejos de la cadena respiratoria, del DNA mitocondrial, de la actividad enzimática oxidativa y de la densidad y tamaño mitocondrial. Así mismo en pacientes diabéticos se ha observado el daño que presentan en la respiración mitocondrial (Kim, J.A., Wei, 2010). Por otra parte, también se ha identificado que las ceramidas inhiben la acción de AKT por dos mecanismos: el primero promueve su desfosforilación vía la proteína fosfatasa 2A, la cual es blanco

directo de los esfingolípidos y el segundo previene la translocación de AKT vía PKC $\zeta$  (Bikman & Summers, 2011). Las ceramidas inhiben también la señal dependiente de insulina hacia AKT (Bikman & Summers, 2011). Además, las ceramidas también pueden alterar la dinámica bioenergética de la mitocondria, ya que afectan la cadena transportadora de electrones y aumentan las especies reactivas de oxígeno (Ussher et al., 2010). Con lo anterior, no está del todo claro si la disfunción de la mitocondria es causa o consecuencia de las alteraciones metabólicas presentes durante la obesidad y su relevancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la DMT2, y también se desconoce qué especies de lípidos son los candidatos más importantes en el desarrollo de patologías metabólicas.

## **Antecedentes directos del proyecto**

En trabajos previos de nuestro laboratorio, empleando un modelo animal de programación fetal en ratas se identificó un incremento de la concentración en sangre de  $5 \times 10^{-3} \text{ nM}$  en la descendencia de madres alimentadas con dieta de hipercalórica, comparado con el control (Madres alimentadas con dieta control). La descendencia también presentó alteraciones metabólicas que incluyeron acumulación de grasa visceral, incremento de las concentraciones de insulina en sangre, leptina y ácidos grasos libres en sangre. De interés, también se encontraron niveles anormalmente altos de ceramida C24:0 en la sangre de pacientes obesos, con y sin DMT2 atendidos en el Hospital Universitario “José Eluterio González” de la UANL

## **Capítulo 3**

### **Justificación**

El incremento de obesidad favorece la presencia de RI y el desarrollo de DMT2. Se propone que durante la obesidad se presenta el incremento en los niveles de ceramidas en sangre que induce RI a través de dos mecanismos potenciales: la activación de estrés del RE y alteraciones en la dinámica y disfunción mitocondrial. Sin embargo, se desconoce la especie de ceramida con mayor potencial de promover resistencia a insulina en humanos obesos dependiente del grupo étnico.

En este proyecto, validaremos si la especie de ceramida C24:0, identificada en modelos murinos y en humanos obesos con diabetes del noreste de México, induce RI a través de la activación de estrés del RE y alteraciones en la dinámica y disfunción mitocondrial.

## Capítulo 4

### Hipótesis

La ceramida C24:0 induce resistencia a la insulina a través de la activación de estrés del retículo endoplásmico y alteración de la dinámica y/o función mitocondrial.

## Capítulo 5

### Objetivos

#### 5.1 Objetivo general

Investigar si la ceramida C24:0 promueve resistencia a la insulina a través de la alteración de la dinámica y/o función y la activación de estrés del retículo endoplásmico empleando modelos *in vitro* e *in vivo*.

#### 5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la ceramida C24:0 sobre la sensibilidad a la insulina empleando las líneas celulares de hepatocitos y adipocitos.
2. Identificar si la resistencia a la insulina se asocia con la dinámica y/o función mitocondrial y la activación de estrés del retículo endoplásmico.
3. Comprobar el efecto de la ceramida C24:0 sobre la sensibilidad a la insulina y niveles de glucosa en plasma de ratones.



## Capítulo 6

### Material y métodos

#### 6.1 Material

##### 6.1.2 Líneas celulares

Línea	Origen
mHypoA-CLU 192	Ratón (hipotálamo)
HUH-7D12	Humano (hepatocarcinoma)
3t3l1	Ratón (pre-adipocitos)

Tabla 2 Líneas celulares utilizadas para los experimentos de este proyecto de resistencia a la insulina, estrés al retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial.

##### 6.1.3 Reactivos

Reactivo	Numero de catálogo
Medio de cultivo DMEM	D5648-10X1L, SIGMA ALDRICH
Suero fetal bovino	35-010-CV, SIGMA ALDRICH
Tripsina	SIGMA ALDRICH
Penicilina/Estreptomicina	P0781-100ml, SIGMA ALDRICH
Ceramida c24:0 (d18:1/24:0)	860524P-10mg, AVANTI POLAR LIPIDS INC
Acido palmítico	, SIGMA ALDRICH
Insulina (novorapid)	8-0902-60-302-7
Albumina sérica bovina	Sc-2323, CHEMCRUZ
Albumina sérica bovina libre de ácidos grasos	BAH66, EQUITECH-BIO, INC

Tabla 3 Reactivos utilizados durante los experimentos. Ceramida C24:0 utilizada para todos los ensayos posteriores, albumina como acarreador de esta.

### 6.1.4 Anticuerpos

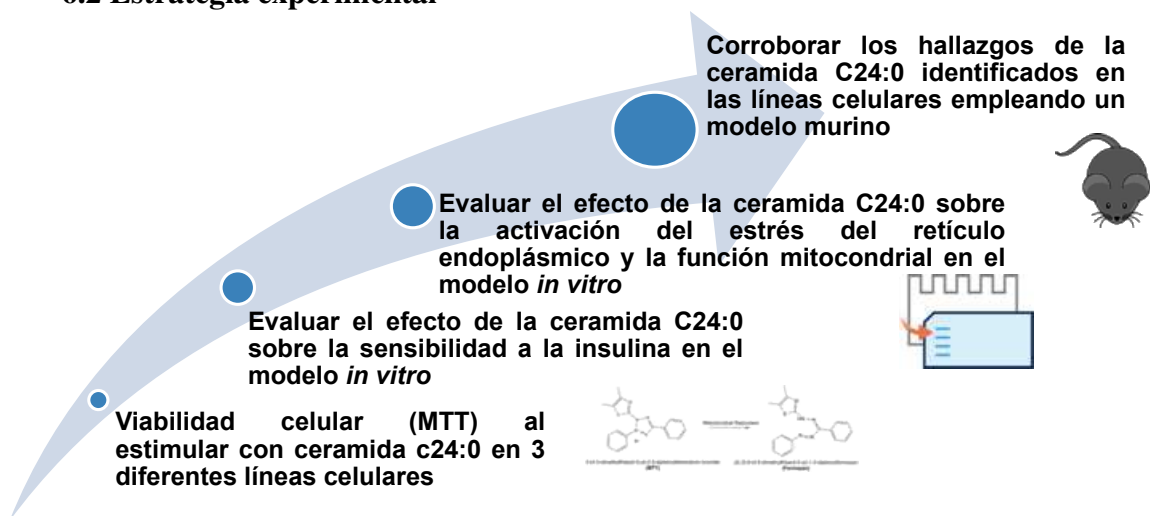
Anticuerpo	Número de catálogo
Calnexina C5C9 rabbit mAB	2679P, cell signal
Ero1-L rabbit ab	3264P, Cell signal
PDI (C81H6) rabbit mAB	3501P, cell signal
P-AKT (S473) mouse mAB	4051S, cell signal
BIP (C50B12) rabbit mAB	3177S, cell signal
$\beta$ 3-TUBULIN (D7169) rabbit mAB	5568P, cell signal
ANTI-RABBIT IgG, HRP-LINKED	7074P2, cell signal
ANTI-MOUSE IgG, HRP LINKED	7076S, cell signal

Tabla 4 Anticuerpos utilizados en el proyecto. P-Akt para medir la resistencia a la insulina, BiP para estrés al retículo, MFN2 para disfunción mitocondrial y Actina como control de carga.

### 6.1.5 Animales y manejo

Se emplearon ratas macho de la cepa C57bl/6, machos, de 4 meses de edad, con un peso de 25-30g. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio y la NOM-062-ZOO- 1999. El protocolo fue autorizado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UANL, con el número de registro BI0002. Las ratas fueron mantenidas en cajas de plexiglás, individuales, a una temperatura de 20-23 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h y comida y agua *ad libitum*, en la jaula del hogar, excepto durante la sesión experimental.

### 6.2 Estrategia experimental



## **6.3 Metodología**

### **6.3.1 Cultivo celular**

Se trabajó con tres líneas celulares en la siguiente forma: HUH7 corresponde a hepatocitos derivados de hepatocarcinoma celular humano, 3T3L1 (fibroblastos de ratón); así como células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (ASCs, por sus siglas en inglés). Todos los cultivos fueron mantenidos en cajas de 25cm<sup>2</sup>, en 5 mL de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (BFS, por sus siglas en inglés), 1% de antibiótico penicilina/estreptomina como concentración final. Las células fueron mantenidas hasta su posterior uso en los próximos experimentos. Se realizaron pasajes sucesivos levantando las células con una solución al 0.025% de tripsina/etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA) y resemebrando de la manera anteriormente descrita.

### **6.3.2 Citotoxicidad, hepática y de adipocitos durante la incubación con la ceramida C24:0**

Se siguieron las instrucciones del protocolo descrito en el Cell proliferation kit I (MTT) de la casa comercial Roche. Se cultivaron 30,000 células por pozo de las tres líneas celulares (neuronas, adipocitos y hepatocitos), en una placa de 96 pozos en medio de cultivo DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico penicilina/estreptomina al 1%, durante 24 horas. La incubación se llevo a cabo a una temperatura de 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente al siguiente día se agrego la ceramida C24:0 a cada uno de los pozos en concentraciones crecientes de 5µM en 5µM hasta 25µM durante 24h. Posterior a este tiempo se agrego el buffer solubilizador durante 6h. Finalmente se leyó la absorbancia de cada pozo en el luminómetro glomax de promega a una absorbancia de 540nm.

### **6.3.3 Diferenciación de la línea celular 3T3L1 y de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)**

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células pozo, en 6 placas de 6 pozos; 1 placa incluyó en 3 pozos al control negativo de diferenciación (no tratado) y el control positivo de diferenciación, la segunda placa fue rotulada como palmítico y ceramida al inicio (en 3 pozos respectivamente), la última placa fue rotulada en 3 pozos como ceramida al final. Se mantuvieron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM adicionado con 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) a una temperatura de 37°C y a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Posteriormente se inició el protocolo de diferenciación, el cual a partir del día 0 cada 3 días se realizó un cambio en los cultivos de medio DMEM por medio de diferenciación (medio de cultivo DMEM, insulina, dexametasona e IBMX), al finalizar el proceso de diferenciación 3 placas se utilizaron para realizar Western Blot (ver abajo métodos) y otras 3 placas se usaron para realizar la tinción de rojo oleoso, como se indica a continuación.

#### **6.3.3.1 Tinción de rojo oleoso**

Con la finalidad de comprobar la diferenciación de las células 3T3L1 y ASC's hacia adipocitos visualización de las gotas de lípidos por medio de la incorporación del colorante rojo oleoso, en el día número 15 del protocolo de diferenciación se retiró el medio de cultivo. Enseguida se realizaron lavados a cada uno de los pozos con 2 mL de amortiguador de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés). Este proceso se repitió tres veces. Se fijaron las células con formalina al 10%, incubando las preparaciones por 15 min y se lavaron las células con PBS. Se agregaron 2 mL de colorante rojo oleoso a cada pozo y se incubó por 2 h/4 °C. y se repitieron los lavados (2mL de PBS, por triplicado). Para finalizar, se extrajeron los lípidos con isopropanol y se cuantificaron con un Luminómetro Glomax, a una longitud de onda de 490 nm.

### **6.3.4 Evaluación del efecto de la ceramida C24:0 sobre la fosforilación de la proteína AKT, y la expresión de BiP y de MFN2**

Se sembraron alrededor de  $6 \times 10^5$  células por pozo (a una confluencia entre el 80%-90%) en 2 placas de 6 pozos, de cada línea celular HUH7, 3T3L1 y ASC's. La ceramida fue previamente disuelta en DMSO y diluida en medio de cultivo DMEM libre de suero adicionado con albumina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA/FAF) al 10%, a una concentración final de  $25 \mu\text{M}$  de ceramida. Se cambió el medio de cultivo habitual por el medio de cultivo libre de suero con el compuesto (ceramida) y las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1, 3 y 6 horas para medir pAkt (al terminar cada uno de los diferentes tiempos se colocó insulina a una concentración  $1 \text{U/mL}$  durante 10 min) y 12, 24, 48 horas para analizar la expresión de BiP y MFN2 por Western Blot, como se indica abajo.

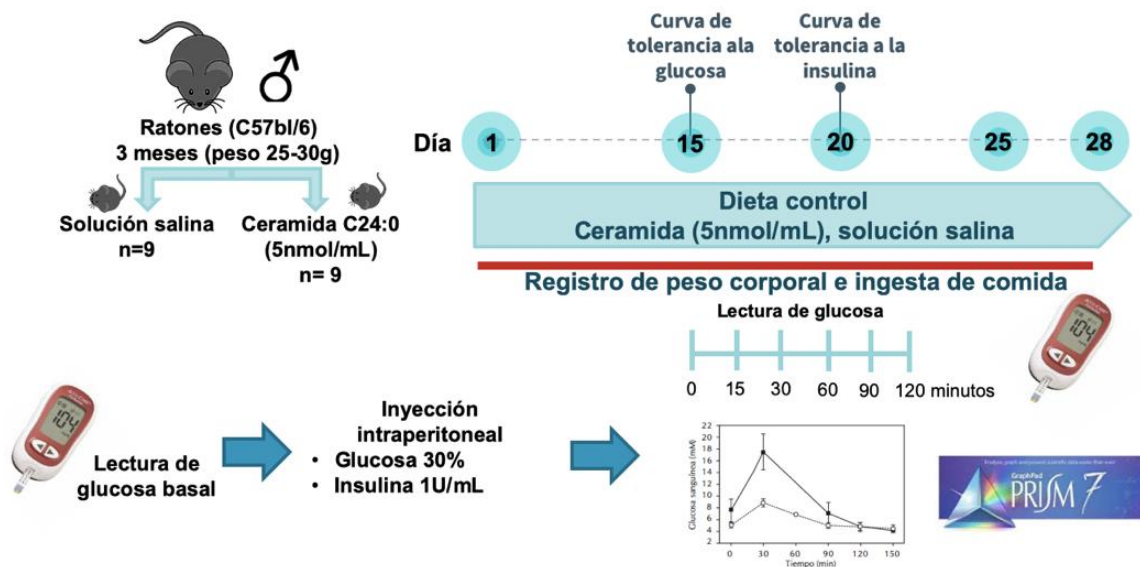
\*Nota: antes de comenzar la estimulación ceramida C24:0, la línea celular 3T3L1, así como ASC's, los cultivos se sometieron condiciones de diferenciación al linaje adipogénico. Una vez hecho esto se siguió el método antes mencionado.

### **6.3.5 Animales y manejo**

Se emplearon ratones macho de la cepa C57bl6 de 3 a 4 meses de edad con un peso entre 25-30g, Los animales fueron manipulados de acuerdo con la guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio y la NOM-062-ZOO- 1999. Los ratones fueron colocados individualmente en jaulas, mantenidos a  $20\text{-}23^\circ\text{C}$  en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. tanto el agua como la comida estaban disponibles ad libitum en la jaula del hogar, excepto durante la sesión experimental.

### 6.3.6 Administración de ceramida C24:0 en el modelo murino

Los ratones fueron agrupados de la siguiente manera: Grupo control, Grupo ceramida. Ambos grupos fueron mantenidos durante 28 días, alimentados con 30 gramos de alimento por día y agua ad libitum. Se registró el peso e ingesta de alimento diariamente. Durante este tiempo se realizaron inyecciones diarias vía intraperitoneal con 100  $\mu$ L de solución salina 4% al grupo control; por otra parte, el grupo ceramida fue inyectado vía intraperitoneal con 100  $\mu$ L de ceramida C24:0 (256.33nM/ml).



**Figura 18** Protocolo de administración de la ceramida C24:0. Muestra los grupos estudio, así como la metodología aplicada al modelo animal durante 28 días.

### 6.3.7 Pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) e insulina (ITT)

Al día 15 y 20 cada uno de los animales se sometió a las pruebas de curva de tolerancia a la glucosa (GTT, por sus siglas en inglés) y curva de tolerancia a la insulina (ITT, por sus siglas en inglés) respectivamente. Los ratones se sometieron a ayuno por 12 horas y se cuantificó la glucosa basal (0 min) a partir de una gota de sangre de la vena caudal, empleando un glucómetro (Accu-Check, Cat. 05987270, Roche). Posteriormente, se les inyectó vía intraperitoneal 30% de glucosa/kg peso o 2U de insulina/kg de peso del

animal (GTT o ITT, respectivamente). Los niveles de glucosa fueron cuantificados a los 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min y 120 min posteriores a la administración.

### **6.3.8 Disección y homogenizado de tejidos y recolección de suero**

Los Ratonos fueron sacrificados por decapitación al día 28 del estudio. Previamente se dejaron en ayunas durante 16h. Se realizó una inyección vía intraperitoneal con insulina (2U/kg) a ambos grupos durante 15min, previo al sacrificio. Pasado el tiempo se procedió a la decapitación, se colectaron muestras de sangre en tubos amarillos de 500  $\mu$ L (Beckton Dickinson) y se aislaron los tejidos (hígado, cerebro, musculo esquelético, páncreas y tejido adiposo); se separó la fracción del suero por centrifugación a 8000 rpm x 10 min a 4°C. Esta fracción fue congelada, junto con los tejidos fueron almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

## **6.4 Extracción de proteínas (cultivo celular)**

Cada uno de los pocillos se homogenizó agregando 80  $\mu$ L del buffer de lisis RIPA, el cual contiene inhibidores de proteasas y fosfatasa, posteriormente el contenido celular fue vaciado a un microtubo de plástico con una capacidad de 200  $\mu$ L. Las células fueron lisadas mediante sonicación empleando el equipo ultrasonicator modelo FB120 de Fisher Scientific, utilizando las siguientes condiciones: tiempo 5s, pulso 05, amplitud 30%, realizando el procedimiento por triplicado. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm, durante 10 min a una temperatura de 4°C. Finalmente se recolectó el sobrenadante de las muestras y se guardaron a -20°C.

### **6.4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

De los modelos animales de los 2 grupos experimentales obtenidos en nuestro protocolo (Grupo control y Ceramida), se tomo un fragmento de tejido (hepático y adiposo) el cual se colocó en tampón de lisis que contiene: 150 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 7,5, que contenía 50 mM de NaF<sub>2</sub>, 10 mM de NaP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM de ortovanadato de sodio, cóctel de inhibidor de proteasa completo y 0.5% de Tritón X-100. Se

homogenizaron por sonicación (5s a 1500 Hz en hielo) posteriormente la muestra se centrifugó durante 10 min x 1500 rpm. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras de cultivo celular y de los tejidos animales colectados, como se describe a continuación.

Se empleó una placa de 96 pozos siguiendo el protocolo a continuación:

- **Curva estándar para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

**Programa de lectura: bradford (600nm), en luminometro glomax de promega**

<b>Pozo (#)</b>	<b>Concentración de proteína (µg/ml)</b>	<b>BSA 1mg/ml (µL)</b>	<b>Bradford (µL)</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>200</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>200</b>
<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>200</b>
<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>200</b>
<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>200</b>
<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>200</b>
<b>7</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>200</b>

**\*Nota realizar el proceso por triplicado**

Una vez obtenido los datos de absorbancia, se utilizo el programa “Prism 7” para calcular las concentraciones de proteína, así como los parámetros de linealidad de la curva de calibración.

**6.5 Western Blot**

Las muestras obtenidas de los experimentos in vitro e in vivo, se mezclaron con Laemmli buffer (5x) - B-mercaptoetanol (2%) y se calentaron a 95°C por 5 min y fueron sometidas a electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes a 95volts por 10 min, 130 volts durante 1h. Posterior a la



electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Ver detalles apéndice 1), se procedió a realizar el bloqueo con albumina sérica bovina al 5%. Posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer TBS + 1% de Tween 20 por 5 min; se agrego el anticuerpo primario y se incubó por toda la noche a 4 °C en agitación.

La evaluación de la resistencia a la insulina se llevó a cabo mediante ensayos el uso del anticuerpo primario p-AKT S473 (D7F19) a dilución de 1:1000 por toda la noche a 4 °C en agitación constante. Se realizaron 3 lavados con buffer TBS-Tween 1% y se colocó el anti-IgG de conejo comercial acoplado a fosfatasa alcalina a dilución 1:10,000 durante 1 h en agitación y temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con buffer TBS-Tween 1% + un lavado con TBS. Por último, se colocó la membrana en el equipo chemidoc de biorad y se añadió la solución de revelado. (Ver apéndice A para composición de soluciones)

## **6.6 Evaluación el efecto de la ceramida C24:0 sobre la dinámica mitocondrial**

Se realizó mediante la técnica de Western blot anteriormente descrita, con la variación de los marcadores utilizados, en este caso se utilizó la proteína Mitofusina 2 (MFN2) como marcador de alteraciones en la dinámica mitocondrial. Se utilizo el anticuerpo primario MFN2 de cell signalig a dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón comercial acoplado a fosfatasa alcalina a dilución 1:10,000 durante 1 h en agitación constante.

## **6.7 Evaluación el efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés al retículo endoplásmico.**

Se realizó mediante la técnica de Western blot anteriormente descrita, con la variación de los marcadores utilizados, en este caso se utilizó la proteína BiP como marcador de estrés al retículo endoplásmico. Se utilizo el anticuerpo primario BiP (C50b12) de cell signaling a una dilución 1:1000 como anticuerpo primario y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo comercial (7076S) de la casa comercial cell signaling.

## 6.8 Estadística

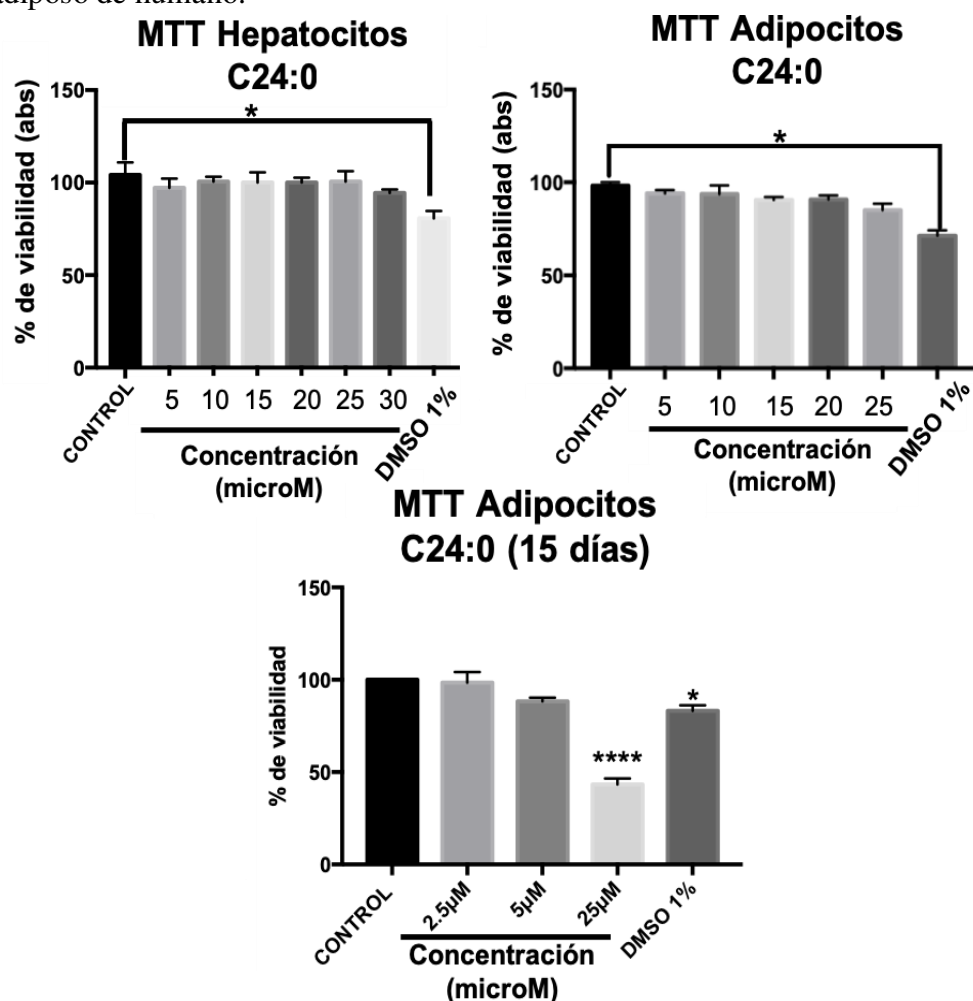
Las imágenes generadas fueron analizadas por el software “image J”, los resultados de densitometría generados de las imágenes fueron analizados en el software “Prism 7”, Los datos presentados fueron analizados usando análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías), análisis de varianza (ANOVA) o la prueba t student. Se realizó la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunnett. Los datos fueron considerados significativos con una \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

## Capítulo 7

### 7.1 Resultados

Evaluación de la viabilidad celular y la resistencia a la insulina en la línea celular 3T3L1, HUH7 y Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC's)

En la primera parte del proyecto determinamos la concentración de ceramida C24:0 con potencial de inducir efectos en la sensibilidad a la insulina sin afectar la viabilidad celular en las líneas celulares de 3T3L1, hepáticas y las mesenquimales de tejido adiposo de humano.

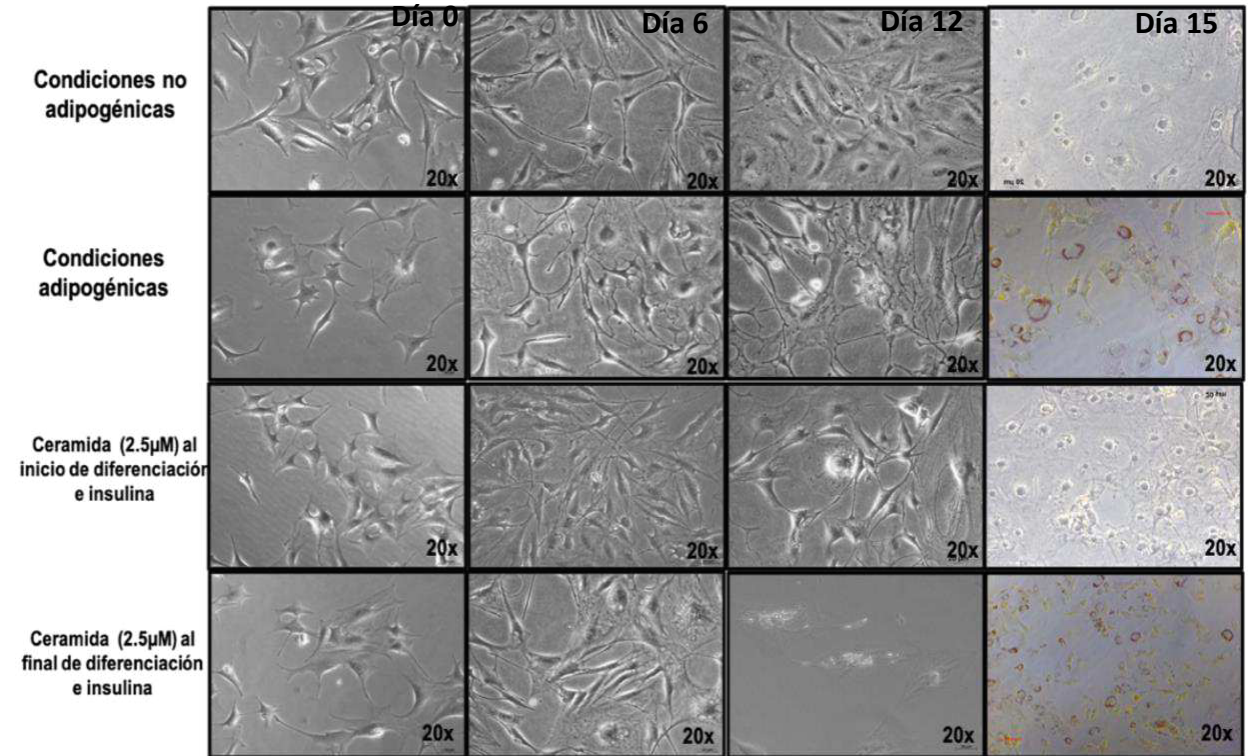


**Figura 19** Ensayo de viabilidad celular MTT. A y B) No se observa diferencia estadísticamente significativa al utilizar diferentes concentraciones de ceramida C24:0 decremento en la viabilidad celular C) Ensayo MTT durante 15 días, se observa un decremento de la viabilidad celular al utilizar la concentración de 25 µM.

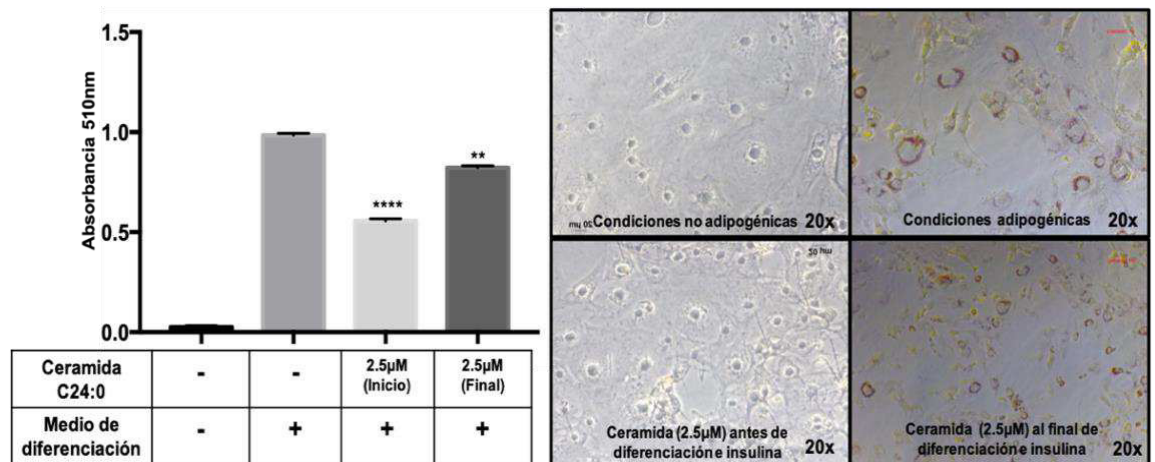
Como se puede apreciar en la Figura 19, la concentración efectiva de C24:0 sin promover decremento en viabilidad es 25 $\mu$ M para las líneas 3T3L1 y hepáticas. Sin embargo, para las mesenquimales de tejido adiposo de humano muestran decremento significativo del 40-50% en viabilidad posterior a la incubación con C24:0 a esta misma concentración. Con base a estos resultados, se seleccionaron concentraciones menores de C24:0 para las mesenquimales de tejido adiposo de humano: 2.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M y 25 $\mu$ M. Como se puede observar en la Figura 19 C, se muestra decremento en la viabilidad celular de hasta 50% en la concentración de 25 $\mu$ M, pero la viabilidad se preserva a la concentración de 2.5  $\mu$ M. Posteriormente, se identificó el efecto de la incubación con 2.5 $\mu$ M C24:0 sobre la diferenciación hacia linaje adipogénico de la línea celular 3T3L1 y de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Este experimento se planteó con base a que la diferenciación hacia linaje adipogénico requiere la estimulación de la señal de insulina, por lo que representa un buen modelo para determinar si la incubación con ceramida favorece el bloqueo de la señal de insulina. Para ello, probamos 2 protocolos, incubar con ceramida al inicio de la diferenciación y el segundo, al final de la diferenciación. Las Figuras 20A y 21A, muestran que la estimulación con el coctel adipogénico que contiene insulina, en la línea celular 3T3L1 y de las células madre mesenquimales, promueve la diferenciación del fenotipo de preadipocito a adipocito maduro mostrando cambios morfológicos, e incremento en la acumulación de lípidos intracelulares, evidenciados por la tinción de rojo oleoso. Por su parte, la incubación con ceramida C24:0 al inicio de la estimulación con el coctel adipogénico, inhibe la diferenciación de adipocitos y los cambios morfológicos. Además, se observa el decremento en la acumulación de lípidos cuantificados con la tinción de rojo oleoso (Figura 20 B y 21 B). De interés, la inhibición de la diferenciación adipogénica y de la acumulación de lípidos inducidos por la C24:0, también se reproduce aún al incubar hasta el día 14 de la diferenciación (Figura 20 B y 21 B). En la siguiente serie de experimentos se analizó el efecto de la ceramida C24:0 sobre la fosforilación de la proteína Akt (pSer 473), como un indicador de resistencia a la insulina. Los resultados muestran que la incubación de ceramida C24:0 durante la diferenciación de adipocitos inhibe de manera significativa la fosforilación de Akt (pSer 473 en las células 3T3L1 (Figura 20B). Además, la incubación de ceramida C24:0 durante

1, 3 y 6h en hepatocitos reproduce el decremento de la fosforilación de Akt (pSer 473) identificado en adipocitos a las 6 h de estimulación (Figura 22A).

### A) Protocolo de diferenciación (línea celular 3T3L1)



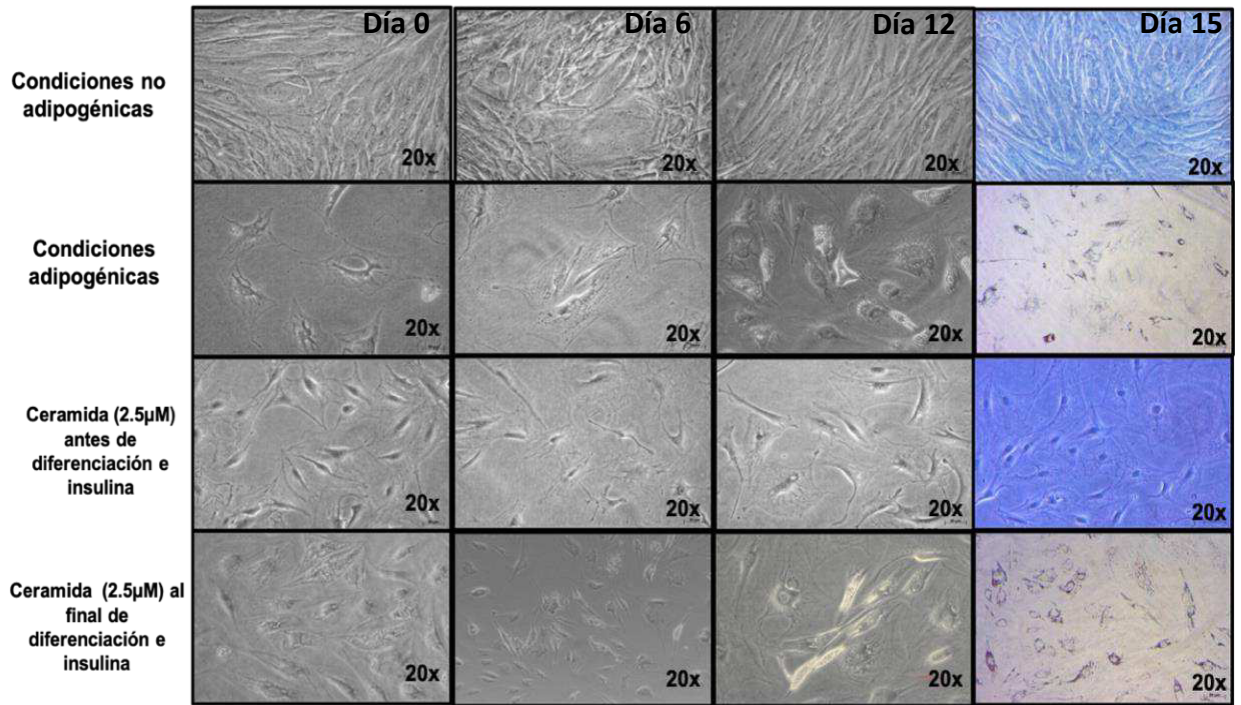
### B)



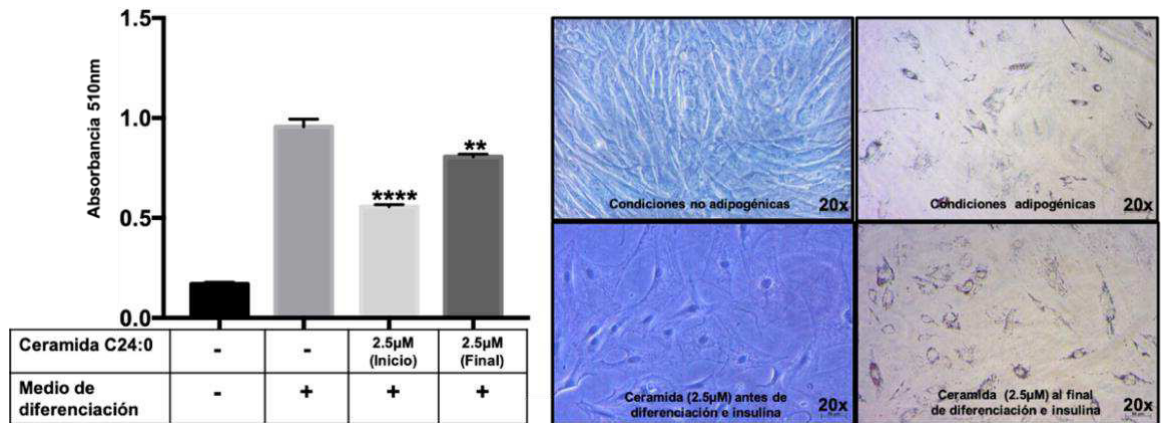
**Figura 20 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la diferenciación celular hacia linaje adipogénico en la línea celular 3T3L1. A)** se observa el proceso de diferenciación hacia linaje adipogénico durante 15 días, destacando que las células mantenidas en condiciones adipogénicas como con ceramida (2.5µM) durante 15 días, no presentan cambios morfológicos ni acumulación de lípidos intracelulares. **B)** Se presenta la cuantificación de los lípidos en los diferentes grupos durante el protocolo de diferenciación hacia linaje adipogénico.

A)

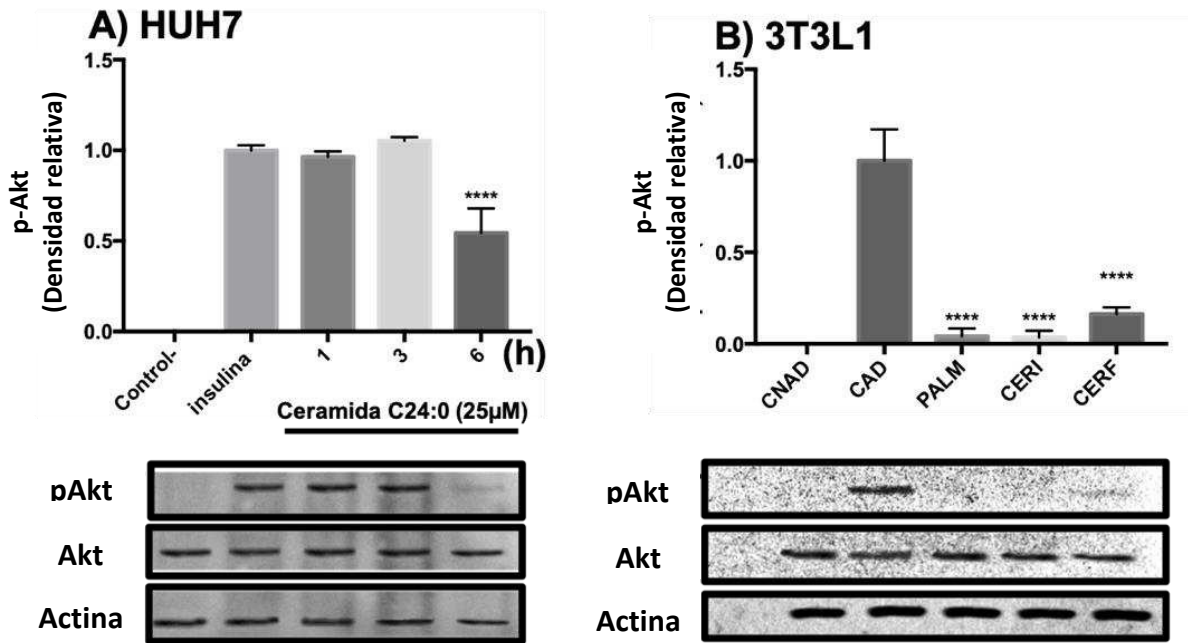
**Protocolo de diferenciación (células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo)**



B)



**Figura 21 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la diferenciación celular de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo hacia linaje adipogénico. A) se observa el proceso de diferenciación hacia linaje adipogénico durante 15 días, destacando que las células mantenidas en condiciones adipogénicas como con ceramida (2.5µM) durante 15 días, no presentan cambios morfológicos ni acumulación de lípidos intracelulares. B) Se presenta la cuantificación lípidos de los diferentes grupos durante el protocolo de diferenciación hacia linaje adipogénico**

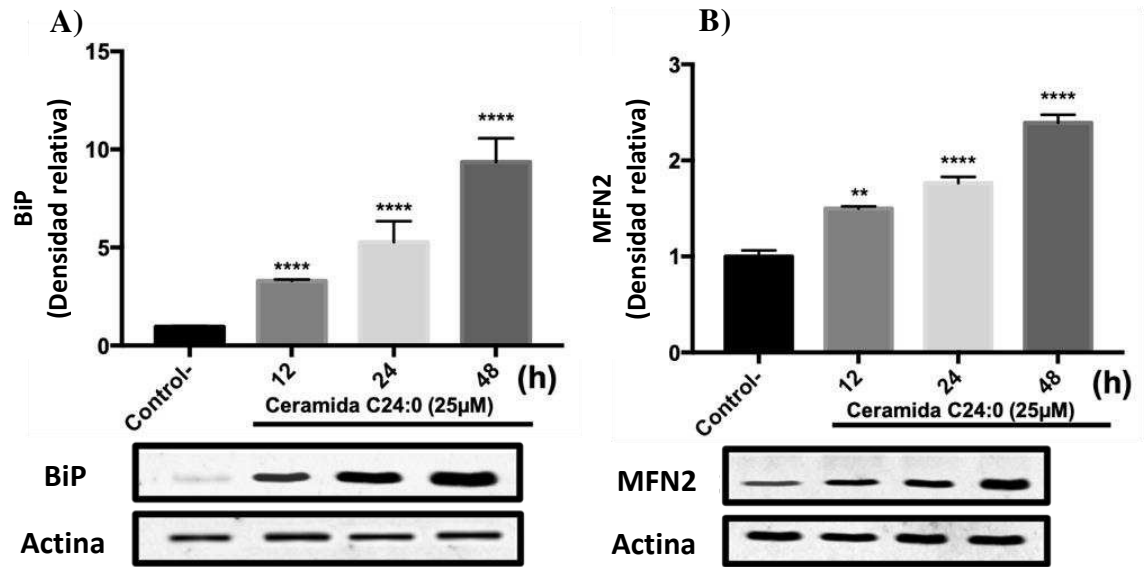


**Figura 22 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la fosforilación de la proteína Akt.** A) Se observa un decremento en la fosforilación de Akt en la línea celular HUH7 a partir de la estimulación con ceramida C24:0 (25μM) durante 6h, indicando resistencia a la insulina. B) Se observa tanto un decremento como una depleción total en la fosforilación de la proteína Akt en los cultivos mantenidos en condiciones adipogénicas con ceramida al inicio tanto como ceramida al final respectivamente, indicando de igual forma resistencia a la insulina. Para el análisis de la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Evaluación de la activación del estrés del RE y dinámica mitocondrial inducidos por ceramida C24:0

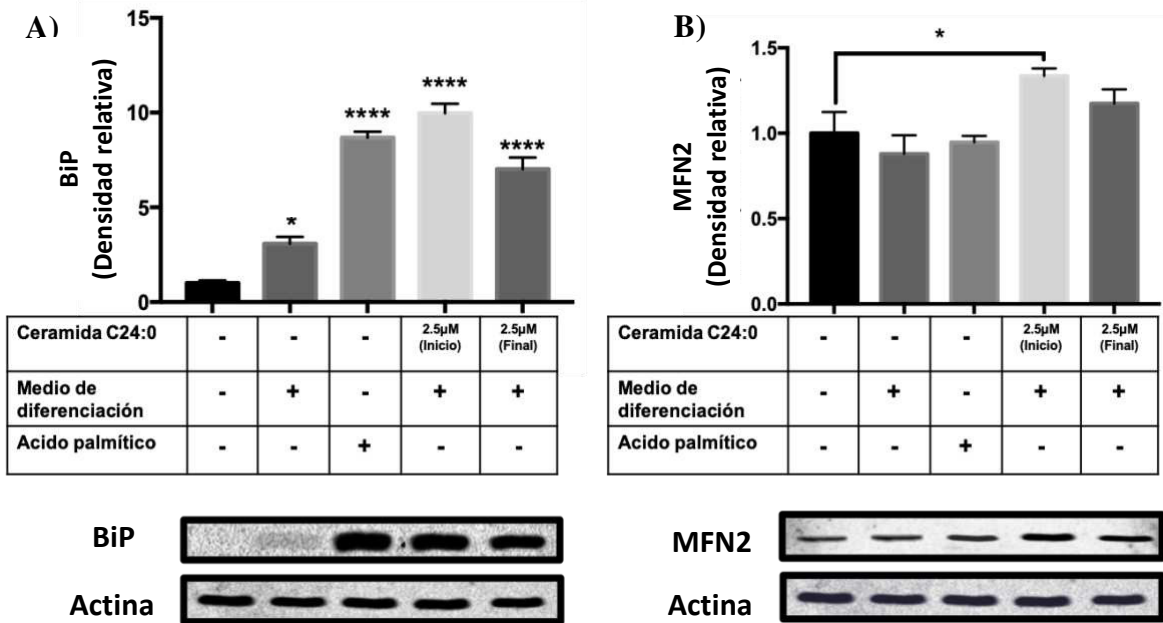
### Línea celular HUH7

Nuestros resultados indican que la incubación con ceramida C24:0 incrementan la expresión dependiente del tiempo de la proteína BiP y MFN2 (Figura 23 A y B). En específico, se observa incremento de BIP y MFN2 a partir de las 12 h posteriores a la estimulación con ceramida C24:0 que se preserva hasta las 48h. Estos resultados confirman que la C24:0 induce activación del ER e incremento en la fusión mitocondrial en la línea celular HUH7.



**Figura 23** Efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés del retículo endoplásmico y alteraciones en la dinámica mitocondrial en la línea celular HUH7. A y B) Se observa el efecto de la ceramida durante 12, 24 y 48H (25µM) sobre los cultivos, destacando la sobreexpresión de BiP como de MFN2. Para el análisis de la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Línea celular 3T3L1**



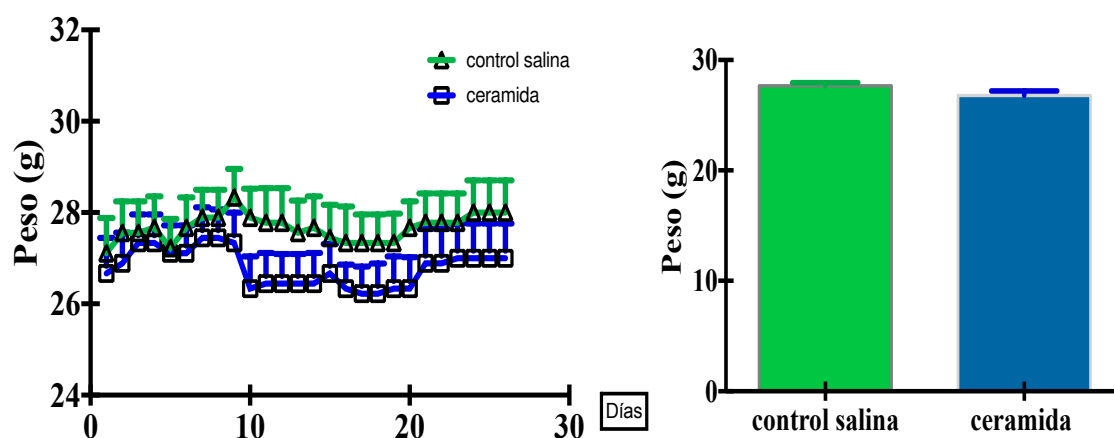
**Figura 24** Efecto de la ceramida C24:0 sobre el estrés del retículo endoplásmico y alteraciones en la dinámica mitocondrial en la línea celular 3T3L1. A y B) Se observa el efecto de la ceramida (2.5µM) sobre los cultivos mantenidos con ceramida al inicio como con ceramida al final, destacando la sobreexpresión de BiP como de MFN2. Para el análisis de la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).



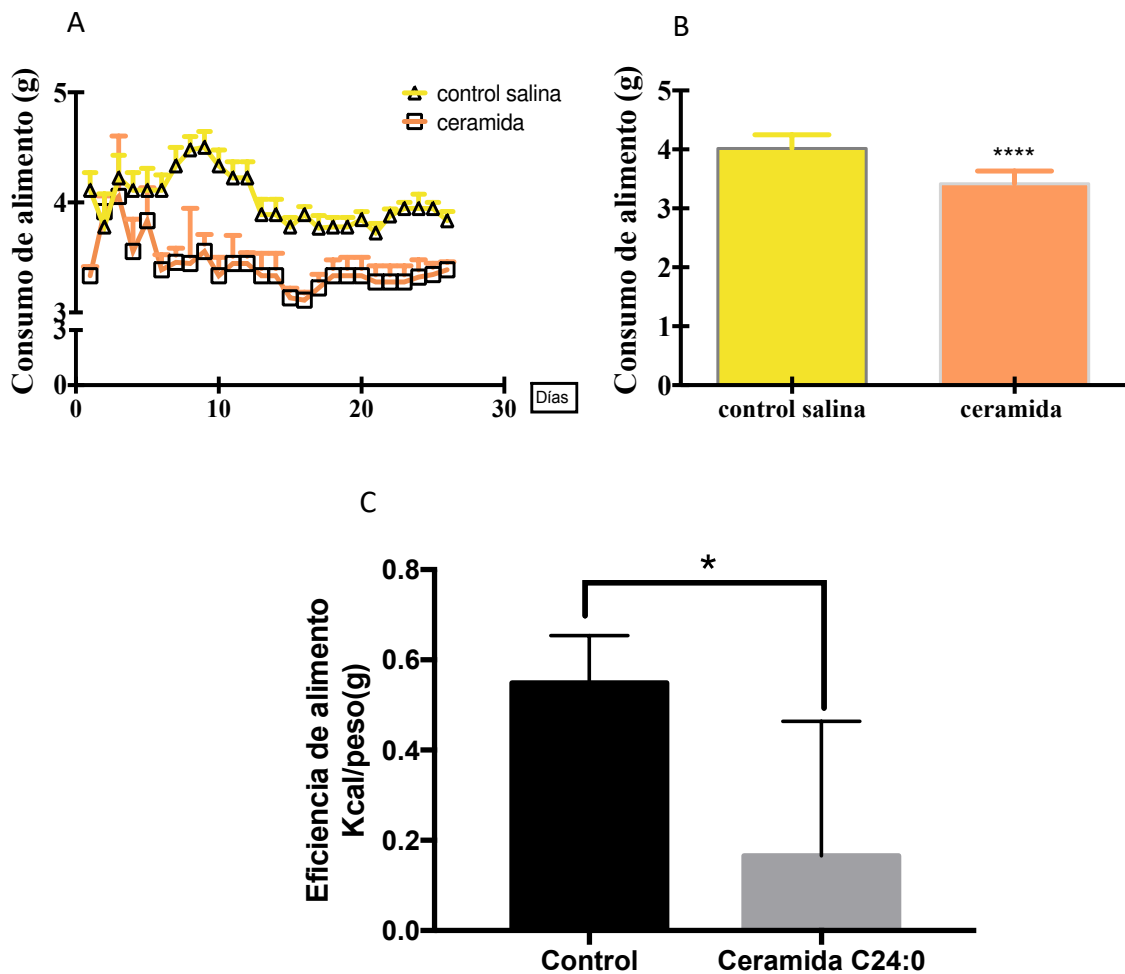
Empleando la línea celular 3T3L1 identificamos un efecto similar al mostrado en la línea celular de hepatocitos. La incubación con C24:0 incrementa la expresión de proteína de BiP y MFN2, cuando se estimuló antes y durante la diferenciación. A diferencia de los hepatocitos, el efecto de la C24:0 sobre el incremento en la expresión de MFN2 en la línea celular 3T3L1 se observa únicamente cuando las células se estimularon crónicamente durante 14 días (figura 24).

### **Efecto de la estimulación crónica de ceramida C24:0 sobre el metabolismo de la glucosa, peso e ingesta de comida en el modelo *in vivo***

El efecto negativo de la ceramida C24:0 sobre la sensibilidad a la insulina, estrés del RE y dinámica mitocondrial se comprobó en un modelo *in vivo*. Los resultados indican que la administración crónica de ceramida C24:0 durante 28 días, no ejerce cambios en el peso corporal comparado con el grupo control (Figura 25 A y B). De interés, la administración de ceramida C24:0 decrece significativamente el consumo de alimento respecto al grupo control (Figura 26 A y B). Integrando las variables de peso e ingesta de alimento identificamos que la administración de ceramida C24:0 decrece la eficiencia en la tasa de alimentación respecto al grupo control (Figura 26 C).

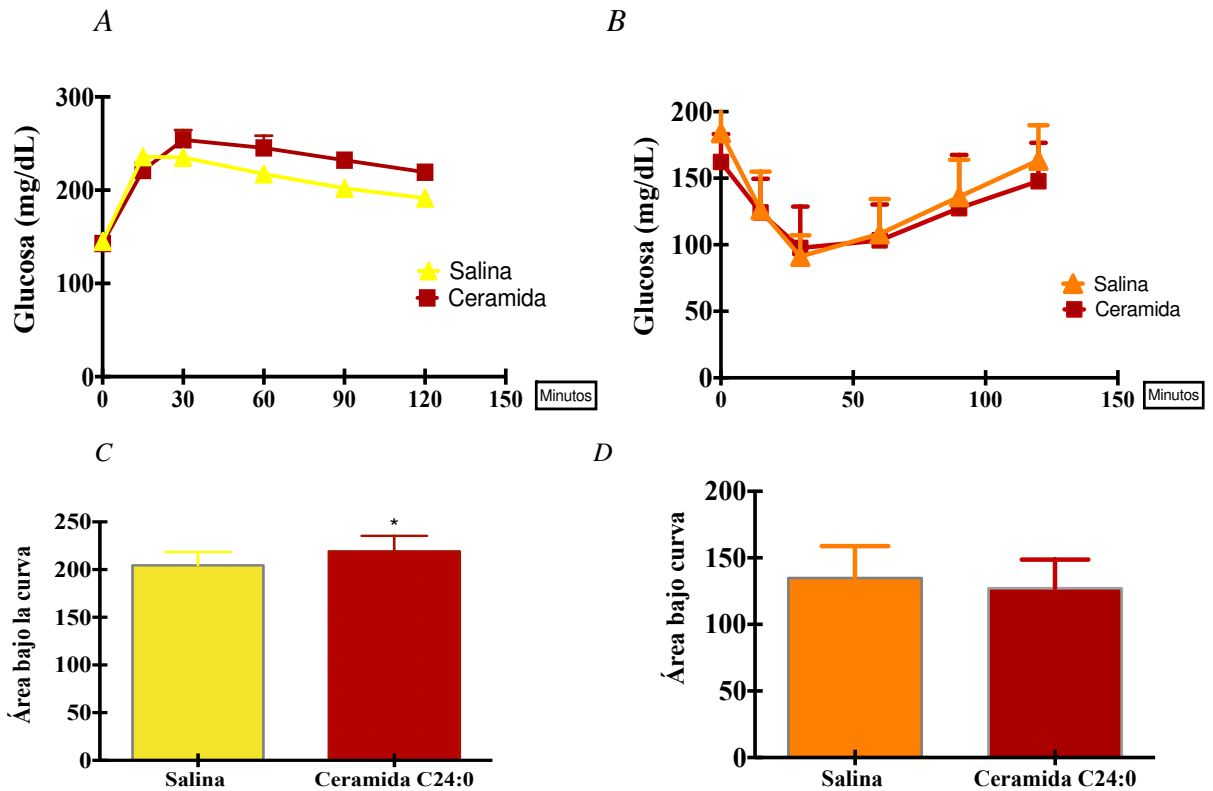


**Figura 25** Efecto de la ceramida C24:0 sobre el peso de ratones después de la estimulación con ceramida durante 28 días. Se puede observar que la ceramida C24:0 propicia un decremento en el peso corporal del grupo denominado “Ceramida” a partir del día 10 de este estudio respecto al grupo inyectado con solución salina que no se observó diferencias en este.



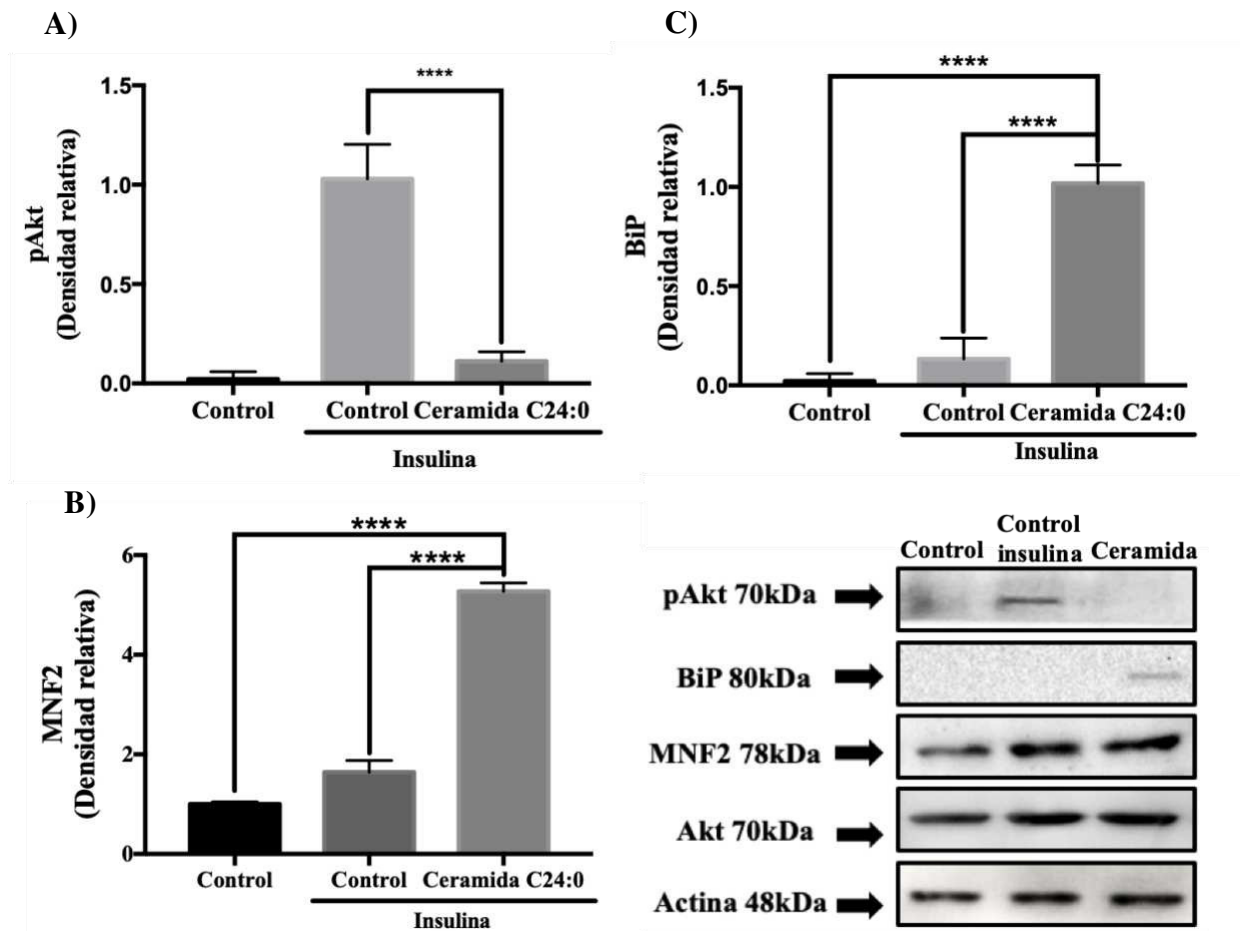
**Figura 26** Efecto de la ceramida C24:0 en el consumo de alimento y eficiencia de alimento de los grupos control salina y ceramida. **A, B, C)** Se observa que el grupo ceramida consumió menos alimento, además tuvo una eficiencia de alimentos menor. Se muestran los promedios  $\pm$  SD. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

En los siguientes experimentos analizamos el efecto de la ceramida C24:0 sobre la sensibilidad a la glucosa e insulina. Se identificó que los ratones administrados con ceramida C24:0 no presentan diferencias significativas en la concentración basal de glucosa. De interés, la C24:0 induce incremento en el área bajo la curva posterior a la prueba de GTT (Figura 27 C). Además, los resultados muestran que no existen cambios en la sensibilidad a la insulina posterior a la estimulación con insulina (2U/Kg) en los grupos Control y los administrados crónicamente con C24:0 (Figura 27 C y D).

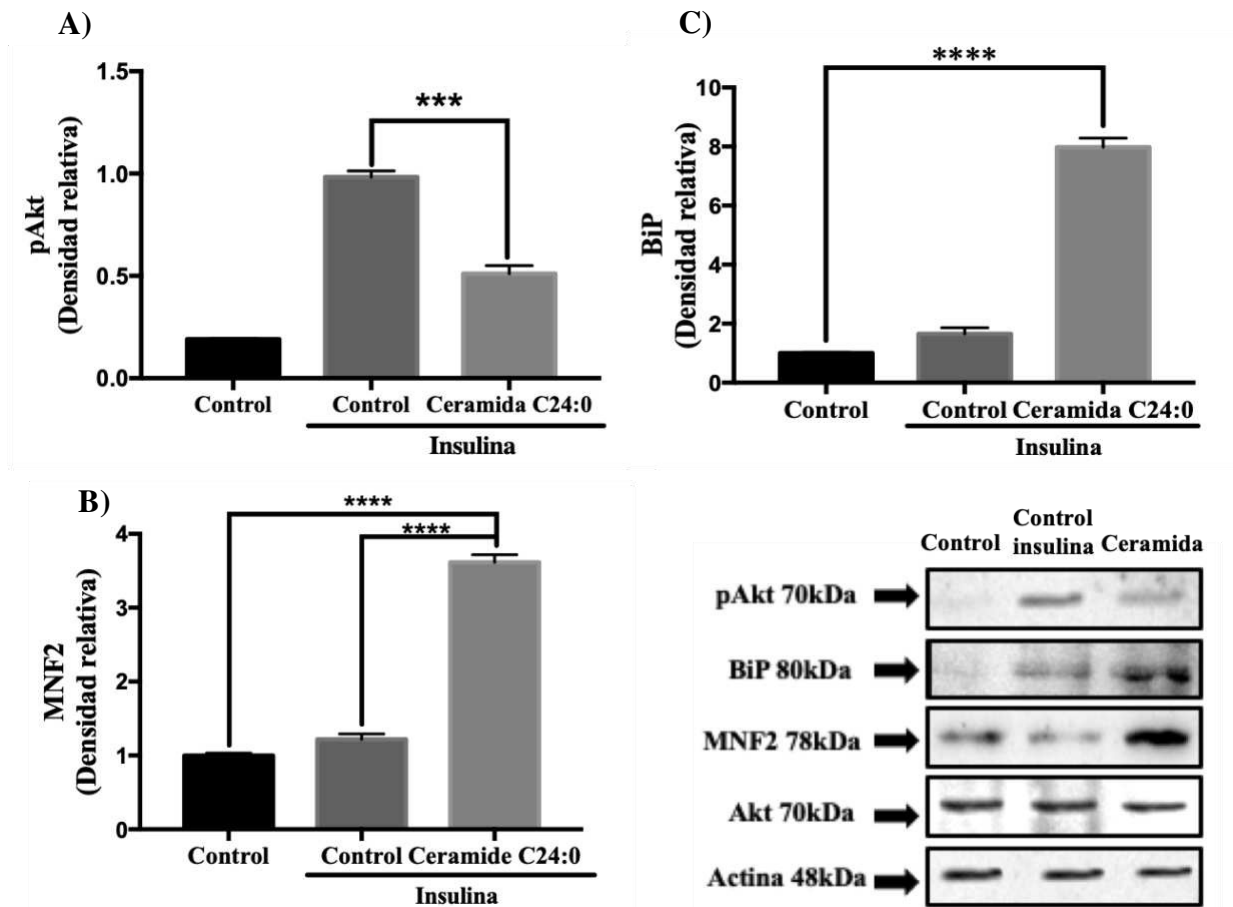


**Figura 27 Efecto de la ceramida C24:0 sobre la concentración de glucosa en sangre de ratones.** A) Se observa la curva de tolerancia a la glucosa, en la cual el grupo tratado con ceramida presenta un aumento en las concentraciones de glucosa a las 2h de realizar la prueba respecto al grupo de solución salina. B) se observa la curva de tolerancia a la insulina en la cual podemos ver que no existe diferencia significativa en ambos grupos al realizar la medición de las concentraciones de glucosa en sangre total. Se realizó una prueba Tstudent para la comparación de ambos grupos ( $p < 0.005$ ).

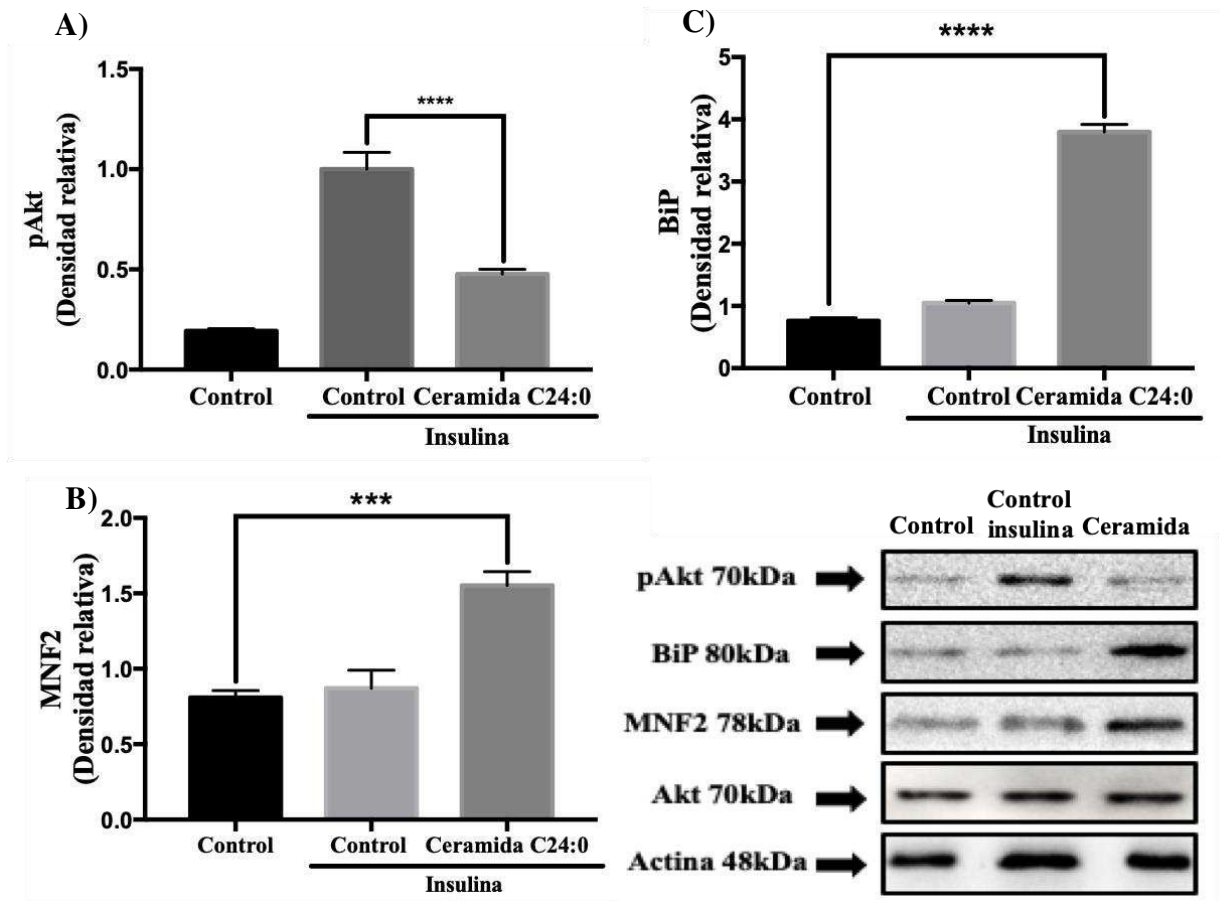
Finalmente evaluamos si la administración con C24:0 correlaciona con defectos en la fosforilación de la AKT y promueve la activación de estrés en el retículo endoplásmico y defectos en la dinámica mitocondrial. Nuestros resultados demuestran que la administración de ceramida C24:0 durante 28 días en el modelo animal, reproduce los resultados identificados en cultivo, mostrando decremento en la fosforilación de la proteína Akt (pSer473), respecto al grupo control (Figuras 28, 29 y 30 A). Además, estos efectos correlacionan con el aumento en la expresión de proteínas como BiP y MFN2 en el hígado, tejido adiposo y músculo de ratones administrados crónicamente con C24:0 (Figuras 28, 29 y 30, B y C).



**Figura 28** Efecto de la ceramida C24:0 en el tejido Hepático sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial. A) fosforilación de la proteína PKB/AKT B) Expresión de la proteína MNF2 C) Expresión de la proteína BiP. Para la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figura 29** Efecto de la ceramida C24:0 en el tejido adiposo sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial. A) fosforilación de la proteína PKB/AKT B) Expresión de la proteína MNF2 C) Expresión de la proteína BiP. Para la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figura 30** Efecto de la ceramida C24:0 en el músculo esquelético sobre la resistencia a la insulina, el estrés al retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial. A) fosforilación de la proteína PKB/AKT B) Expresión de la proteína MNF2 C) Expresión de la proteína BiP. Para la expresión de proteínas se realizó una prueba ANOVA de una vía más una prueba post hoc de Dunnett (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Capítulo 8

### Discusión

La presencia de un fenotipo obeso exhibe el incremento de diversas especies de lípidos en la sangre y su potencial acumulación en órganos metabólicamente relevantes para el control del metabolismo. Entre las especies de lípidos candidatos para ejercer efectos negativos en el metabolismo se encuentran las ceramidas quienes se han relacionado directamente con el desarrollo de la resistencia a la insulina y defectos en el control hormonal de los niveles de glucosa. Sin embargo, se desconoce qué tipo de especie (s) de ceramida (s) podrían ser los marcadores más fuertes en promover el deterioro en la sensibilidad a la insulina. En este trabajo confirmamos a través de estudios *in vitro* e *in vivo* que la especie de ceramida C24:0 es un efector eficiente de la generación de resistencia a la insulina, e importantemente promueve el incremento en los niveles de glucosa en la sangre de ratones, decreciendo la fosforilación de AKT en músculo, hígado y tejido adiposo. La hipótesis inicial del presente trabajo fue planteada con base a la identificación de la ceramida C24:0 como un potencial marcador de daño metabólico empleando modelos animales y en muestras de humano obeso con/sin DMT2. En estos trabajos identificamos que tanto en hombres y mujeres con obesidad y DMT2 la Cer 24:0 muestra incremento en su concentración en sangre, en comparación al grupo de obesos sin DMT2, siendo mas afectadas las mujeres respecto a los hombres. Además, identificamos que la exposición a dieta alta en grasa o cafetería durante la programación fetal y posterior al destete de ratas, induce el incremento en las concentraciones totales de ceramidas entre las que destacan las especies Cer 22:0, Cer 24:0 y Cer 25:0 (CÁRDENAS, 2018). De esta manera, en esta tesis se identificó si la Cer 24:0 promueve decremento en la sensibilidad a la insulina y aumento en los niveles de glucosa en plasma, empleando modelos *in vitro* e *in vivo*. Nuestros experimentos *in vitro* empleando la línea celular 3T3L1 y las células mesenquimales diferenciadas a adipocitos demuestran que la ceramida C24:0 parece regular la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos maduros y afecta de manera rotunda la sensibilidad a la insulina. Específicamente, por una parte, identificamos que la incubación de los preadipocitos al día 1 de diferenciación inhibe la diferenciación hacia el linaje adipogénico, el cuál intrínsecamente depende de la señal de

la insulina. En este contexto, se conoce que la insulina promueve la expresión de dos genes importantes para la diferenciación de adipocitos, el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ ) y la CCAAT / proteína  $\alpha$  de unión al potenciador (CEBPA). La acción conjunta de PPAR $\gamma$  y el C/EBP $\alpha$  promueven la expresión CD95, la glicerofosfato deshidrogenasa, la acetil-CoA carboxilasa (ACO), el receptor de glucosa GLUT 4, el receptor de insulina y la proteína aP2/FABP (la proteína que liga ácidos grasos, específica del adipocito), entre otros (Spiegelman et al., 1993). A través de la activación de este programa transcripcional se promueve la formación de gotas lipídicas en el citoplasma de las células. Nuestros resultados comprueban que la ceramida C24:0 no sólo decrece el grado de diferenciación hacia un fenotipo adipogénico, sino también decrece el porcentaje de lípidos acumulados en el citoplasma de las células, confirmando el efecto negativo en la adipogénesis. En la siguiente serie de experimentos confirmamos si los defectos en la diferenciación adipogénica ejercida por la ceramida C24:0, dependía en parte de la inhibición de la señal de la insulina. En el presente estudio se demostró que la estimulación de las células HUH7 y 3T3L1, con ceramida C24:0 (25  $\mu$ M) durante 6h produce un decremento en la fosforilación del residuo ser473 de la proteína AKT; indicándonos defectos en la señal de la insulina en estas líneas celulares. Nuestros resultados coinciden con estudios publicados anteriormente, donde se estimularon células neuronales SY5Y con ceramida C-2 (50 $\mu$ M) durante 6h, observando un decremento en la fosforilación de Akt (Hsieh, Chuang, Yang, Yin, & Lin, 2014). De igual forma, la estimulación con la ceramida C-2 (100 $\mu$ M) durante 2h, decrece la fosforilación de Akt (Kwon, Gamache, Lee, & Querfurth, 2015). Cabe mencionar que hasta la fecha los trabajos publicados sobre ceramidas corresponden a especies de cadena corta (2-6 carbonos) y cadena media (8-16 carbonos), es por ello que nuestra investigación demuestra y complementa el efecto de la ceramida y en especial de la especie C24:0 como un promotor eficiente la resistencia a la insulina. Sumado a los resultados observados en el modelo animal y a la capacidad de las ceramidas para inactivar la proteína Akt/PKB (Stratford, Hoehn, Liu, & Summers, 2004).



El efecto negativo sobre la señal de insulina identificado en el modelo *invitro*, se comprobó empleando un modelo murino. Los resultados mostraron que la administración intraperitoneal de ceramida C24:0 durante 28 días, causa decremento parcial o total en la fosforilación de la proteína AKT en el residuo Ser473, analizada en el tejido hepático, musculo y adiposo. Este resultado no se encuentra reportado en la literatura a la fecha. Sin embargo, Turnbaugh et al en 2008 encontraron que efectos lipotóxicos inducidos por la exposición de dieta alta en grasa durante 16 semanas, induce una menor fosforilación en la proteína AKT, respecto al grupo control que fue alimentado con dieta control. Por otra parte, una de las hipótesis a probar en el presente trabajo fue determinar si la administración de ceramida C24:0 a ratones altera los niveles de glucosa en sangre. En el modelo animal se observó que la administración intraperitoneal crónica con ceramida induce alteraciones en los niveles de glucosa. Estos experimentos correlacionan con el reportado por Ussher et al en 2010, quienes demostraron que ratones alimentados con dieta alta en grasa poseen mayores niveles de glucosa en sangre comparados con el grupo control. Además, Pascoe et al en 2012, demostraron que la administración de intraperitoneal de un compuesto denominado Lyposin II (pool de diversos ácidos grasos como glicerol y ácido palmítico) incrementa los niveles de glucosa en plasma. Además, nuestros resultados también demostraron que las alteraciones en la homeostasis de glucosa correlacionan con el decremento en la fosforilación de Akt en el tejido, hepático y adiposo, lo cual asemeja a lo reportado con anterioridad Calegari VC *et al* en 2011. Además, nuestros resultados del modelo in vivo también demostraron que el tratamiento con ceramida C24:0 durante 28 días no afecta el peso de los animales, pero si decrece la ingesta de alimento, lo que se traduce con un decremento en la eficiencia en la alimentación. Finalmente, en la última parte del proyecto identificamos si la ceramida C24:0 promueve cambios en la expresión de la Mitofusina 2 (MFN2) y la activación del estrés del retículo endoplásmico (BiP), y su correlacionarlo con la sensibilidad a la insulina. Los resultados nos indican que el tratamiento con ceramida C24:0 (25µM) durante 12, 24 y 48 h; promueve la sobre expresión de las proteínas Bip y MFN2 a partir de las 12 horas de estimulación en hepatocitos y adipocitos. Así mismo, comprobamos el efecto en la sobreexpresión de BiP y MFN2 inducido por la estimulación de ceramida C24:0 en adipocitos y en la línea celular HUH7, empleando ratones machos de la cepa C57bl/6. Los

resultados mostraron que la administración intraperitoneal de ceramida C24:0 (5nM/mL) por 28 días indujo la sobreexpresión proteica de BiP y MFN2 hasta 2.5 veces en el tejido hepático, muscular y adiposo, respectivamente. Estos tejidos han sido propuestos como uno de los principales sitios en los cuales se presenta la resistencia a la insulina en un contexto lipotóxico (Carobbio, Rodriguez-Cuenca, & Vidal-Puig, 2011).

En los últimos años se han propuesto que alteraciones en la dinámica mitocondrial anudado a un estrés en el retículo endoplásmico están íntimamente implicados en la resistencia a la insulina; por una parte las ceramidas promueven un estrés al retículo endoplásmico provocado por una rigidez estructural en la membrana del retículo, este responde desplegando la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) para recuperar la homeostasis, mediante la sobreexpresión de proteínas como: BiP, calnexina, ERO-1, las cuales fomentaran el correcto plegamiento de las proteínas; sin embargo, si esta respuesta es prolongada se procede a la sobre expresión de otras proteínas como BCL-2, CHOP, lo que ocasiona la activación de la apoptosis celular (Gutiérrez-Rodelo, Roura-Guiberna, & Olivares-Reyes, 2017). En la mitocondria se eleva la actividad de quinasas como PKC y JNK, incrementando la fosforilación de IRIS-1, lo que conlleva a la inhibición de la transmisión de la señal en la vía PI3K/AKT, culminando con la resistencia a la insulina. También se sabe que una función mitocondrial alterada reduce la expresión de IRIS-1, lo cual a largo tiempo promueve resistencia a la insulina (Gutiérrez-Rodelo et al., 2017). Apoyando nuestra propuesta, Mayer et. al. 2010 proponen a la proteína JNK como causante del estrés de retículo endoplásmico en células neuronales tratadas con ácido palmítico (200  $\mu$ M) y que su activación es a partir de las 4 h post-tratamiento. De la misma manera Yang et. al. 2012 y Nie Q et. al. 2014, demuestran que el ácido palmítico incrementa la fosforilación de JNK en líneas celulares de músculo esquelético. Por otra parte, recientes investigaciones realizadas por Hammerschmidt et al., en 2019 determinaron que los ratones alimentados con dieta alta en grasa presentan una mayor acumulación de grasa ectópica en diferentes órganos, entre ellos el hígado (esteatosis), observando alteraciones en la dinámica mitocondrial (mayor fragmentación mitocondrial), resistencia a la insulina; lo mismo fue observado en el grupo denominado deficiente de ceraminidasa 6 (Cers6).

En resumen, la administración crónica de la ceramida C24:0 induce incremento en la glucosa en plasma que correlaciona con el decremento de la fosforilación de la ser473 de la Akt en tejido adiposo, hígado y músculo de ratones. Así mismo, proponemos que la ceramida C24:0 promueve directa o indirectamente la resistencia a la insulina a través de la activación del estrés al retículo endoplásmico y alteraciones en la dinámica mitocondria.

## Capítulo 9

### Conclusión

La estimulación con ceramida C24:0 en modelos in vivo e in vitro, previamente identificada tanto en humanos (obesos con y sin diabetes mellitus tipo 2), así como en ratones provenientes de programación por dietas hipercalóricas, promueve:

- Resistencia a la insulina evidenciado por decremento en la fosforilación de Akt que correlaciona con el incremento de glucosa en sangre.
- Defectos en la diferenciación celular hacia el linaje adipogénico
- Alteración de dos mecanismos relacionados con la resistencia a la insulina
  - Activación del estrés del retículo endoplásmico (↑BiP)
  - Disfunción mitocondrial (↑MFN2)

## Capítulo 10

### Referencias

- Adams, J. M., Pratipanawat, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R. A., Sullards, M. C., & Mandarino, L. J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*.
- Aguer, C., McCoin, C. S., Knotts, T. A., Thrush, A. B., Ono-Moore, K., McPherson, R., ... Harper, M. E. (2015). Acylcarnitines: Potential implications for skeletal muscle insulin resistance. *FASEB Journal*, 29(1), 336–345. <https://doi.org/10.1096/fj.14-255901>
- Aláiz, E. P. (2009). Función de los esfingolípidos en la señalización celular. *Monografías de La Real Academia Nacional de ...*, 235–278. <https://doi.org/10.1093/biomet/asu060>
- Anjani, K., Lhomme, M., Sokolovska, N., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Bouillot, J. L., ... Tordjman, J. (2015). Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.002>
- Arruda, A. P., Pers, B. M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., & Hotamisligil, G. S. (2014). Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3735>
- Avruch, J. (2001). Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade. *Recent Progress in Hormone Research*. <https://doi.org/10.1210/rp.56.1.127>
- Barquera, S. (2010). Obesidad en México: epidemiología 2010. *Gaceta Médica de México*, 146(146), 397–407. Retrieved from [https://www.anmm.org.mx/GMM/2010/n6/38\\_vol\\_146\\_n6.pdf](https://www.anmm.org.mx/GMM/2010/n6/38_vol_146_n6.pdf)
- Bastarrachea, Raúl A. Laviada- Molina, Hugo, Machado-Domínguez, Ldefonso, KentJR, Jack, López-Alvarenga, Juan Carlos, Comuzzie, A. G. (2005). El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización

- intracelular. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 13, 180–189.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bikman, B. T., & Summers, S. A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI57144>
- Bolado, E., Jr, J. K., López-, J. C., Téllez-mendoza, J., Blangero, J., & Comuzzie, A. G. (2006). Vinculando la respuesta inflamatoria, la obesidad y la diabetes con la sobrecarga (estrés) del retículo endoplásmico a través de las acciones de la selenoproteína S. *Endocrinología y Nutrición*, 14(2), 89–101.
- Boucher, Jeremie, Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Boucher, Jérémie, Kleinridders, A., & Ronald Kahn, C. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Brillat, A. (1826). Composición corporal Manual de Nutrición y Dietética, 1–7.
- Broskey, N. T., Obanda, D. N., Burton, J. H., Cefalu, W. T., & Ravussin, E. (2018). Skeletal muscle ceramides and daily fat oxidation in obesity and diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 82, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.12.012>
- Burton, P., & Hilton, S. (2016). To Participation and Beyond? *Politics and Social Activism: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications*, 21(6), 1662–1675. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9461-3.ch083>
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., ... Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Camacho, A., Huang, J. K., Delint-Ramirez, I., Yew Tan, C., Fuller, M., Lelliott, C. J., ... Franklin, R. J. M. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator-1 alpha coordinates sphingolipid metabolism, lipid raft composition and

- myelin protein synthesis. *European Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12281>
- Cárdenas-Pérez, R. E., & Camacho, A. (2016). Roles of calcium and Mitochondria-Associated Membranes in the development of obesity and diabetes. *Medicina Universitaria*, *18*(70), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.10.004>
- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., De La Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., ... Camacho, A. (2018). Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition and Metabolism*, *15*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0279-6>
- CÁRDENAS, R. E. (2018). EFECTOS DE LA PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL MATERNA EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA.
- Care, D. (2017). Introduction. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc15-S001>
- Carobbio, S., Rodriguez-Cuenca, S., & Vidal-Puig, A. (2011). Origins of metabolic complications in obesity: Ectopic fat accumulation. the importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834ad966>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- Chaurasia, B., & Summers, S. A. (2015). Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>
- Cnop, M., Fougère, F., & Velloso, L. A. (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.010>
- Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas. (2017). *Diabetes Atlas. Federación Internacional de Diabetes* (Vol. 8). <https://doi.org/2-930229-80-2>
- Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D. A., ... López, M. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Reports*.

- <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.057>
- Dávila-Batista, V., Gómez-Ambrosi, J., Fernández-Villa, T., Molina, A. J., Frühbeck, G., & Martín, V. (2016). Escala colorimétrica del porcentaje de grasa corporal según el estimador de adiposidad CUN-BAE. *Atencion Primaria*, *48*(6), 422–423. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2015.09.003>
- de la Maza, M. P., Rodriguez, J. M., Hirsch, S., Leiva, L., Barrera, G., & Bunout, D. (2015). Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. <https://doi.org/10.1007/s12603-014-0548-7>
- DeFronzo, R. A. (2010). Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*, *53*(7), 1270–1287. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1684-1>
- Días Salinas, B. E. (2014). *Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina*. universidad autonoma de nuevo leon.
- Diaz, B., Fuentes-Mera, L., Tovar, A., Montiel, T., Massieu, L., Martínez-Rodríguez, H. G., & Camacho, A. (2015). Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.014>
- Duan, R. D., & Nilsson, Å. (2009). Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Progress in Lipid Research*. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.04.003>
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>
- Freya, T. G., & Mannellab, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Godes, A. C., Morillas, A. C., & Pitarch, C. A. (2015). Guía de Actuación Clínica en A. P, 3, 16. Retrieved from [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-doc/guia\\_obesidad.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-doc/guia_obesidad.pdf)
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gaceta Medica de Mexico*, *153*(2), 214–228. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x>



- Han, J., & Kaufman, R. J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1329–1338.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.R067595>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2011). Bioquímica (PDF) 5ta edición - harvey.
- Hernández, R., Teruel, T., & Lorenzo, M. (2002). Ceramida como mediador de la resistencia a insulina producida por el factor de necrosis tumoral alfa en adipocitos marrones. *Anales de La Real Academia de Farmacia*, 68(3), 541–560.
- Hewitt, V. L., & Whitworth, A. J. (2017). Mitochondrial Fission and Fusion. In *Parkinson's Disease: Molecular Mechanisms Underlying Pathology*.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803783-6.00003-1>
- Holland, W. L., & Summers, S. A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0025>
- Hsieh, C. T., Chuang, J. H., Yang, W. C., Yin, Y., & Lin, Y. (2014). Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle. *Cellular Signalling*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.03.004>
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays In Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1042/bse0470053>
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002>
- Jivraj, S. (2016). Obesity. In *Antenatal Disorders for the MRCOG and Beyond*.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107585799.013>
- Jo, Y., Okazaki, H., Moon, Y. A., & Zhao, T. J. (2016). Regulation of Lipid Metabolism and Beyond. *International Journal of Endocrinology*, 2016, 10–12.  
<https://doi.org/10.1155/2016/5415767>

- Kang, S., Tsai, L. T. Y., & Rosen, E. D. (2016). Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.002>
- Kasumov, T., Solomon, T. P. J., Hwang, C., Huang, H., Haus, J. M., Zhang, R., & Kirwan, J. P. (2015). Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C14:0 ceramide in obesity and type 2 diabetes. *Obesity*. <https://doi.org/10.1002/oby.21117>
- Kim, J.A., Wei, Y. (2010). Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance, *102*(4), 401–414. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165472>.Role
- Kotronen, A., Velagapudi, V. R., Yetukuri, L., Westerbacka, J., Bergholm, R., Ekroos, K., ... Yki-Järvinen, H. (2009). Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1282-2>
- Kwon, B., Gamache, T., Lee, H. K., & Querfurth, H. W. (2015). Synergistic effects of  $\beta$ -amyloid and ceramide-induced insulin resistance on mitochondrial metabolism in neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.012>
- Lee, Y., Naseem, R. H., Duplomb, L., Park, B.-H., Garry, D. J., Richardson, J. A., ... Unger, R. H. (2004). Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405499101>
- León-Mimila, P., Vega-Badillo, J., Gutiérrez-Vidal, R., Villamil-Ramírez, H., Villareal-Molina, T., Larrieta-Carrasco, E., ... Canizales-Quinteros, S. (2015). A genetic risk score is associated with hepatic triglyceride content and non-alcoholic steatohepatitis in Mexicans with morbid obesity. *Experimental and Molecular Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.012>
- Lizcano, J. M., & Alessi, D. R. (2002). The insulin signalling pathway. *Current Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00777-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00777-7)
- López, M. H. Á. J. R. D. T. S. L. L. C. N. L. M. G. A. E. B. G. P. M. R. M. I. M. G.-H. P. S. H. S. V. H. J. P. G. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016, 2016. <https://doi.org/10.21149/8593>

- Manuel Moreno, G. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70288-2](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70288-2)
- Mao, C., & Obeid, L. M. (2008). Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.06.002>
- Martorell, A. (2014). Breve introducción a la dinámica mitocondrial. *Encuentros En La Biología*, (151), 179–181.
- Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., ... Kita, K. (2008). Characterization of overall ceramide species in human *stratum corneum*. *Journal of Lipid Research*, 49(7), 1466–1476. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800014-JLR200>
- 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*. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1122>
- Miles, B. (2003). The Electron Transport Chain. <https://doi.org/10.1525/abt.2014.76.7.7>
- Minet, A. D., & Gaster, M. (2010). ATP synthesis is impaired in isolated mitochondria from myotubes established from type 2 diabetic subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.115>
- Moreno, M., Gandoy, G., Benito, J., González, A., Jesús, M., La, M. D. E., ... Comparativo, A. (2001). España Más información del artículo Sistema de Información Científica Red de Revistas Científicas de América Latina , el Caribe , España y Portugal ORIGINAL Vicente Martín Moreno , Juan Benito Gómez Gandoy y María Jesús Antoranz González Body Fat Estimate.
- Muñoz, D. S. (2006). Universidad De Barcelona Facultad De Farmacia Departamento De Bioquímica Y Biología Molecular Resistencia a La Insulina Inducida Por Ácidos Grasos En Células De Músculo Esquelético L6E9: Papel De La Carnitina Palmitoiltransferasa I (Cpt I), (Cpt I).
- Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T. A., ... Matsuhisa, M. (2005). Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin

- resistance and diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 847–851.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M411860200>
- Olivares Reyes, J. A., & Arellano Plancarte, A. A. (2008). Bases Moleculares De Las Acciones De La Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Pajuelo, J., & Pando, R. (2006). Resistencia a la insulina en adolescentes con sobrepeso y obesidad, 67(1), 23–29. <https://doi.org/10.24875/ALAD.18000303>
- Pascoe, J., Hollern, D., Stamateris, R., Abbasi, M., Romano, L. C., Zou, B., ... Alonso, L. C. (2012). Free fatty acids block glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db11-0991>
- Pearson, G., & Cobb, M. (2002). Functions and Modulation of Map Kinase Pathways. *Tocris Reviews*.
- Pinzón, C., Serrano, M., & Sanabria, M. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)*, 7(2), 47–66.  
<https://doi.org/10.12804/REVISTAS.UROSARIO.EDU.CO/REVSALUD/A.358>
- Pons, F. E. (2010). Acciones de la insulina sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 0(0), 179–206.  
<https://doi.org/es/monoranf.v0i0.1051>
- Prieto, M., Krochik, A. G., Chaler, E., Maceiras, M., Villalba, A., Valdez, S., ... Mazza, C. (2012). Obesidad y factores de riesgo del síndrome metabólico en jóvenes con diabetes tipo 1. *Medicina (Argentina)*, 72(4), 291–297.
- Puhl, R. M., & Heuer, C. A. (2009). The Stigma of Obesity: A Review and Update. *Obesity*. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.636>
- Regueiro-gómez, A. (2015). Medición de la Variabilidad de la Impedancia Eléctrica Corporal en Sujetos con Padecimientos Renales Crónicos, (February), 1–15.
- Sámano, J. M., Victoria, P., Durán, T., Antonio, M., & Oropeza, J. (2013). Artículos de revisión Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 56(1), 5–18. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v56n1/v56n1a2.pdf>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common

- threads and missing links. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
- Sánchez, R., & Arboleda, G. (2008). Mitochondria y muerte celular. *Nova*, 6(10), 190–200.
- Saucedo García, M., & Gavilanes Ruíz, M. (2005). Las Map Cinasas : Elementos De Señalización En La Defensa De Las Plantas Contra Patógenos. *Reb*, 4 noviembr(1), 4–11.
- Shah, C., Yang, G., Lee, I., Bielawski, J., Hannun, Y. A., & Samad, F. (2008). Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709950200>
- Sharma, K., Karl, B., Mathew, A. V., Gangoiti, J. A., Wassel, C. L., Saito, R., ... Naviaux, R. K. (2013). Metabolomics Reveals Signature of Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013020126>
- Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*.
- Stratford, S., Hoehn, K. L., Liu, F., & Summers, S. A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: Dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36608–36615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406499200>
- Tonks, K. T., Coster, A. C., Christopher, M. J., Chaudhuri, R., Xu, A., Gagnon-Bartsch, J., ... Samocha-Bonet, D. (2016). Skeletal muscle and plasma lipidomic signatures of insulin resistance and overweight/obesity in humans. *Obesity*, 24(4), 908–916. <https://doi.org/10.1002/oby.21448>
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>
- Unger, R. H., & Scherer, P. E. (2010). Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: A roadmap to lipotoxicity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.009>

- Ussher, J. R., Koves, T. R., Cadete, V. J. J., Zhang, L., Jaswal, J. S., Swyrd, S. J., ... Lopaschuk, G. D. (2010). Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db09-1293>
- Vidal-Puig, A., & Carmena Rodríguez, R. (2014). Obesidad y síndrome metabólico. In *Farreras-Rozman. Medicina Interna. Metabolismo y Nutrición. Endocrinología*. <https://doi.org/10.1016/b978-84-9022-595-0.00012-0>
- WHO. (2016). Obesity and overweight: Fact sheet. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0345:CPEABH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0345:CPEABH]2.0.CO;2)
- Wigger, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Nicolas, A., Denom, J., Fernandez, N., Fumeron, F., ... Thorens, B. (2017). Plasma Dihydroceramides Are Diabetes Susceptibility Biomarker Candidates in Mice and Humans. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.019>
- World Health Organization/Regional Office For The Eastern Mediterranean. (2018). WHO EMRO | Obesity | Health topics. <https://doi.org/10.1021/ja01599a079>
- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine in China*. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0262-6>
- Zamora, D., Chávez, N. C., & Méndez, N. (2004). Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Medigraphic*, 11, 149–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.47.1.1>