

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Efecto diferencial de ácidos grasos y carbohidratos sobre el estrés oxidativo y función mitocondrial en una línea celular de hipotálamo”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Itzel Pérez Ayala

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Co-dirigida por:

Dr. Alberto Camacho Morales

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Diciembre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Efecto diferencial de ácidos grasos y carbohidratos sobre el estrés oxidativo y función mitocondrial en una línea celular de hipotálamo”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Itzel Pérez Ayala

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Co-dirigida por:

Dr. Alberto Camacho Morales

Dra. Minerva Ramos Gómez
Presidente

Dr. Alberto Camacho Morales
Secretario

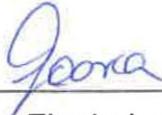
Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente

Dr. Luis Alberto Madrigal Pérez
Suplente



Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

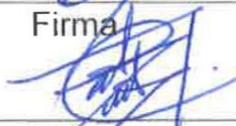


Firma

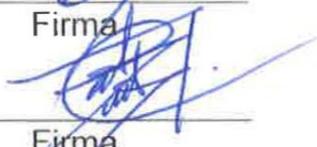
RÚBRICA



Firma



Firma



Firma

RÚBRICA

Firma

RESUMEN

La homeostasis energética implica, principalmente, el control de la ingesta de alimentos y el gasto calórico, regulados por interacciones bidireccionales entre el sistema nervioso central y órganos periféricos, donde el hipotálamo es una estructura clave del cerebro en esta interacción, regulando la homeostasis energética. Sin embargo, bajo un balance energético positivo, por ejemplo, durante el consumo descontrolado de carbohidratos y lípidos, el hipotálamo puede ser un blanco de toxicidad que lleve a la generación del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial neuronal, característicos de estados patológicos como la obesidad. No obstante, se desconoce el papel de la sobrecarga de nutrientes selectiva en la homeostasis de energía. En este proyecto se estudió el efecto del aumento de carbohidratos y ácidos grasos, como glucosa (GLU; 15, 35 y 55 mM), fructosa (FRU; 15, 35 y 55 mM), ácido palmítico (AP; 0.15, 0.20 y 0.25 mM) y ácido oleico (AO; 0.15, 0.35 y 0.55 mM), sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial en una línea celular hipotalámica (mHypoA-CLU192). El estado oxidativo se evaluó mediante el análisis de marcadores de sistemas antioxidantes como el glutatión (GSH), donde se observó un aumento del 50-80% a partir de las dos concentraciones más bajas de FRU y la más alta de GLU, AP y AO. De manera similar, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) aumentó entre 70-100% bajo la suplementación más alta de GLU, FRU y AP; mientras que, la liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no mostró variaciones significativas. Se observó un efecto citotóxico a altas concentraciones de FRU y AP, en tanto que no se presentaron cambios en la viabilidad celular a ninguna concentración de GLU. Se observó que el AO ejerce un efecto citoprotector independiente de la concentración. Finalmente, la función mitocondrial se evaluó a través de la relación ADP/ATP y la tasa de consumo de oxígeno. Se encontró una disminución significativa de 60-70% y 30% de ATP después de la estimulación de carbohidratos y ácidos grasos, respectivamente. Además, se corroboró que bajo la estimulación con GLU y FRU se inhibe la respiración mitocondrial, para ambos complejos de alimentación evaluados (I y II) de la cadena transportadora de electrones. Mientras que el AP y AO muestran este efecto únicamente para la ruta alimentada al complejo I. Con base en estos resultados, la sobrecarga de GLU, FRU, AP y AO juega un papel significativo en la activación del estrés oxidativo en las células cerebrales; además se observó un efecto diferencial dependiente de nutrientes sobre la función mitocondrial. Se propone que el estrés oxidativo selectivo y las alteraciones de la función mitocondrial por parte de los nutrientes pueden ser moduladores potenciales de los entornos de homeostasis metabólica, como la ingesta de alimentos o el gasto de energía.

Palabras clave: Hipotálamo, carbohidratos, ácidos grasos, estrés oxidativo, mitocondria.

SUMMARY

Energy homeostasis involves the control of food intake and caloric expenditure, bidirectional regulated by the central nervous system and peripheral organs interactions, where the hypothalamus is a key brain structure on this interaction. However, under positive energy balance such as during uncontrolled consumption of carbohydrates and lipids, the hypothalamus might be a target of toxicity leading to neuronal oxidative stress activation and mitochondria dysfunction. However, the role of selective nutrient overload during obesity is unknown. In this project the effect of increased carbohydrates and fatty acids, such as glucose (GLU; 15, 35 y 55 mM), fructose (FRU; 15, 35 y 55 mM), palmitic (PA; 0.15, 0.20 y 0.25 mM) and oleic (OA; 0.15, 0.35 y 0.55 mM) acids, on oxidative stress and mitochondrial function was studied using the mHypoA-CLU192 hypothalamic cell line. Oxidative state was evaluated by analysis of antioxidant system activation markers such as glutathione (GSH), where a 50-80 % increase was achieved at the two lowest concentrations of FRU and the highest of GLU and both fatty acids. Similarly, the activity of glutathione peroxidase (GPX) increased at the highest level of GLU, FRU and PA, while the release of hydrogen peroxide (H_2O_2) did not show significant variations. In addition, we observed a cytotoxic effect at high FRU and PA concentrations, and no changes in cellular viability at any GLU concentration, whereas OA exerts a dose-independent cytoprotective effect. Finally, mitochondrial function was evaluated through the ADP/ATP ratio and oxygen consumption rate. We found a significant 60-70 % and 30% ATP decrease after carbohydrates and fatty acids stimulation, respectively, when compare with control. In addition, it has been confirmed that stimulation with GLU and FRU inhibits mitochondrial respiration, for both feeding complexes evaluated (I and II) of the electron transport chain. While the AP and AO show this effect only in complex I pathway. Based on these results, GLU, FRU, PA and OA overload play a significant role on oxidative stress activation in brain cells; whereas a differential nutrient-depending effect on mitochondrial function was observed. We propose that selective oxidative stress and mitochondrial function alterations by nutrients might be potential modulators of metabolic homeostasis settings such as food intake or energy expenditure.

Key words: Hypothalamus, carbohydrates, fatty acids, oxidative stress, mitochondria.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir un trabajo tan arduo y lleno de aprendizaje como el desarrollo de una tesis quisiera agradecer a aquellos que directa o indirectamente proporcionaron herramientas, apoyo y guía para alcanzar el objetivo planteado. Primeramente, agradezco a Dios por la oportunidad de cumplir esta meta, esperando avanzar un paso más en el entendimiento de sus propósitos, como lo dijo alguna vez el científico francés Luis Pasteur “Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a él”.

Agradezco a mis padres Servando y Maritza por todo su apoyo a lo largo no solo de esta maestría sino de mi vida, a mis hermanas Katy y Mitzi, a toda la familia y amigos que siempre han estado para apoyarme y aconsejarme. Y especialmente a Abisai, mi apoyo incondicional mi coach y el amor de mi vida.

Estoy en deuda con aquellos que me acompañaron en este camino, aquellos con quienes sufrimos y triunfamos juntos, en especial a Rebeca, Isac, Humberto, Bety, Vane y Raúl que fueron mi refugio en momentos duros, también a Eli, Delia, Magui y Beto por su complicidad y apoyo en el laboratorio nada habría sido igual sin todas estas maravillosas personas en mi vida, lo que era una meta profesional la convirtieron en una aventura de vida.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Minerva Ramos por aceptarme y asesorarme en la realización de esta tesis en conjunto con el Dr. Alberto Camacho, su apoyo, confianza y su capacidad para guiar mis ideas han sido invaluable. Igualmente, agradezco a cada uno de los integrantes de mi comité que además de encaminar este proyecto, enriquecieron mi visión del mundo de la ciencia y me animaron a ser mejor cada día. Al Dr. Juan Carlos González Hernández y a la M.C. Melina Canizal García del Instituto Tecnológico de Morelia, les agradezco el apoyo técnico y el enriquecimiento que le dieron a este proyecto, siempre es satisfactorio trabajar con personas apasionadas en el campo y con una gran calidad humana.

Quiero hacer un agradecimiento especial para el Dr. Luis Alberto Madrigal por hacerme ver la sencillez de las cosas, por enseñarme a ver los problemas desde perspectivas diferentes.

Finalmente agradezco Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por hacer posible mi participación en este proyecto y el financiamiento para llevarlo a cabo.

“¿La ciencia ha prometido la felicidad? No lo creo. Ha prometido la verdad y la cuestión es saber si con la verdad se conseguirá algún día la felicidad.” Emilé Zola

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. EL HIPOTÁLAMO REGULA LA HOMEOSTASIS DE ENERGÍA	2
2.2. METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN EL HIPOTÁLAMO Y SU EFECTO EN LA FUNCION NEURONAL.....	9
2.3. EL INCREMENTO DE ÁCIDOS GRASOS DURANTE LA OBESIDAD PROMUEVE LIPOTOXICIDAD EN EL HIPOTÁLAMO	11
2.4. ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN MODELOS DE SOBREALIMENTACIÓN	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. OBJETIVO GENERAL	17
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1. CULTIVO CELULAR	18
5.2. ESTÍMULOS HIPERCALÓRICOS	18
5.3. VIABILIDAD CELULAR	19
5.3.1. Ensayo MTT	19
5.4. EVALUACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	21
5.4.1. CONCENTRACIÓN DE DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH).....	21
5.4.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLITATIÓN PEROXIDASA (GPX)	22
5.4.3. LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H ₂ O ₂).....	23
5.5. FUNCIÓN MITOCONDRIAL	23
5.5.1. RELACIÓN ADP/ATP	23
5.5.2. VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO	24
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.5. VIABILIDAD CELULAR	26
5.6. ACTIVACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES	31
5.6.1. CARBOHIDRATOS	31
5.6.1.1. ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO.....	31
5.6.1.2. AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA ₃₂	
5.6.1.3. LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	33
5.6.2. ÁCIDOS GRASOS	35

5.6.2.1.	ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO.....	35
5.6.1.2.	AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA36	
5.6.1.3.	LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	37
5.7.	EFFECTO EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	38
5.7.1.	CARBOHIDRATOS.....	38
5.7.1.1.	AUMENTO EN LA RELACIÓN ADP/ATP.....	38
5.7.1.2.	VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO.....	40
5.7.2.	ÁCIDOS GRASOS.....	42
5.7.2.1.	AUMENTO EN LA RELACIÓN ADP/ATP	42
5.7.2.2.	VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO.....	44
6.	CONCLUSIONES	46
7.	REFERENCIAS	48

Índice de figuras

Figura		Pág.
1	Anatomía del interior del cerebro	2
2	Núcleos hipotalámicos	3
3	Señales metabólicas y neuronales en el núcleo arcuato	5
4	La acción de leptina e insulina en el núcleo arcuato hipotalámico	8
5	Metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo y regulación de la ingesta	10
6	Vías metabólicas favorecidas por los niveles elevados de glucosa	12
7	Cascadas de señalización de inflamación metabólica en el hipotálamo	14
8	Efecto en la viabilidad celular, después de la estimulación con diferentes concentraciones de glucosa y fructosa	27
9	Efecto en la viabilidad celular, después de la estimulación con diferentes concentraciones de ácidos palmítico y oleico	29
10	Efecto en la viabilidad celular, después de la estimulación con diferentes concentraciones de terbutilhidroperóxido	30
11	Nivel de glutatión reducido (GSH), después de la estimulación con GLU y FRU por 24 h.	32
12	Inducción de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX), después de la estimulación con GLU y FRU	33
13	Nivel de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) liberado, después de la estimulación con GLU y FRU	34
14	Nivel de glutatión reducido (GSH), después de la estimulación con AP y AO.	35
15	Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX), después de la estimulación con AP y AO.	36
16	Nivel de peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂), después de la estimulación con GLU y FRU	37

17	Relación ADP/ATP relativo al control después de la estimulación con GLU y FRU	39
18	Efecto en el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cultivos celulares suplementados con GLU y FRU	41
19	Relación ADP/ATP relativo al control después de la estimulación con AP y AO	43
20	Efecto en el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cultivos celulares suplementados con AP y AO	45
21	Resumen del efecto de estímulos hipercalóricos en viabilidad, estado oxidativo y función mitocondrial en células hipotálamicas.	47

Índice de tablas

Tabla		Pág.
1	Concentraciones de glucosa, fructosa, ácidos palmítico y oleico a suplementar en cultivos celulares de hipotálamo.	15

1. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del balance energético depende de la regulación de tres procesos principalmente: la ingesta de alimentos, el gasto de energía y el almacenamiento de grasa, que funciona como una reserva calórica y permite la adaptación a variaciones ambientales y nutricionales. Estos procesos están regulados por un sistema neuroendócrino a través de interacciones bidireccionales entre órganos periféricos y el sistema nervioso central (SNC), capaces de monitorear el estado metabólico del individuo, integrar la información obtenida y responder a las necesidades del organismo (Korner *et al.*, 2017). Las diferentes señales hormonales y nutricionales, ejercen su acción en gran parte, sobre el hipotálamo y el tronco del encéfalo (Williams & Fruhbeck, 2009). El hipotálamo es quizá la estructura predilecta en el control de la homeostasis de energía, ya que posee poblaciones de neuronas glucosensoras que permiten incrementar o disminuir las concentraciones de glucosa extracelular y la producción de glucosa hepática, además de monitorear cambios en la concentración de ácidos grasos y de aminoácidos (Song *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2005). Sin embargo, dicha asociación se compromete en un escenario de ganancia positiva de energía, tal como sucede durante la obesidad, donde se ven alteradas estas señalizaciones. Tomando en cuenta que ante estrategias de control de peso el porcentaje de individuos que logra llegar al “peso ideal” o normopeso no rebasa el 2% (Nicklas *et al.*, 2012), es importante considerar la afectación y el posible blanco molecular que representa el hipotálamo en una estrategia de control integral, ante patologías relacionadas con el desbalance del metabolismo energético. En este contexto, se pretende demostrar que el incremento en el estrés oxidativo y/o disfunción mitocondrial son dos rutas de daño celular asociadas al desbalance molecular de la homeostasis elucidando cuál es el efecto específico de los diferentes nutrientes y a diferentes concentraciones en la función mitocondrial como blanco molecular de la sobrecarga energética y como consecuencia de esto evaluar el estrés oxidativo como mecanismo de daño a biomoléculas en las células neuronales que afecta su funcionalidad, para tomarlo en cuenta en las estrategias de control.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. EL HIPOTÁLAMO REGULA LA HOMEOSTASIS DE ENERGÍA

El hipotálamo es una región del SNC localizado debajo del tálamo, a ambos lados del tercer ventrículo, en la parte inferior del encéfalo (Figura 1). Tiene gran importancia en la modulación de hormonas de la hipófisis, y regula la temperatura corporal, la alimentación, ingesta de líquidos, apareamiento y agresión. Es el principal regulador de las funciones viscerales autónomas y endocrinas (Heuvel *et al.*, 2014).

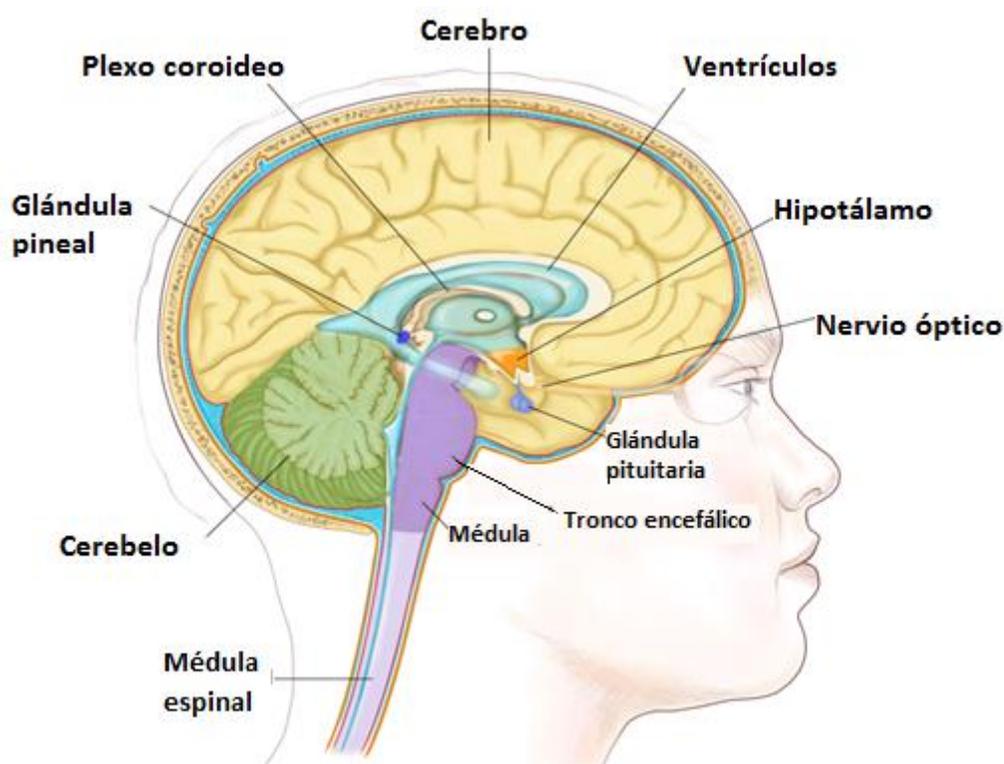


Figura 1. Anatomía del interior del cerebro. Se muestra el hipotálamo, las glándulas pineal y pituitaria, nervio óptico, ventrículos (con líquido cefalorraquídeo mostrado en azul) y otras partes del cerebro (Tomado y modificado de NCI, 2010).

El hipotálamo está estructurado anatómica y funcionalmente en núcleos neuronales bien definidos que se conectan entre sí a través de proyecciones axonales, estableciendo una compleja red neuronal (Figura 2). Los núcleos reciben e integran multitud de señales periféricas anorexigénicas (inhibidoras del apetito) y

orexigénicas (activadoras del apetito), incluyendo las señales circulantes en sangre (como glucosa o ácidos grasos), hormonas (como leptina o grelina) y péptidos gastrointestinales, como neuropéptido Y (NPY), o colecistoquinina. De una manera descriptiva, los núcleos hipotalámicos pueden agruparse en un hipotálamo medial y un hipotálamo lateral. El hipotálamo medial lo constituyen los núcleos arcuato (ARC), paraventricular (PVH), núcleo ventromedial (VMH) y dorsomedial (DMH); aunque todos son componentes clave en el control homeostático del apetito y del metabolismo energético, cada uno cumple diferentes funciones (Olney, 1969).

Se ha observado que las lesiones del hipotálamo ventromedial y en los núcleos ARC y PVH causaban aumento de la ingesta y el peso, mientras que las lesiones laterales se traducían en afagia y pérdida de peso, estableciéndose la existencia de un “centro de la saciedad” y un “centro del apetito” en el hipotálamo, donde gran variedad de neuropéptidos regulan la conducta alimentaria (Minor *et al.*, 2009).

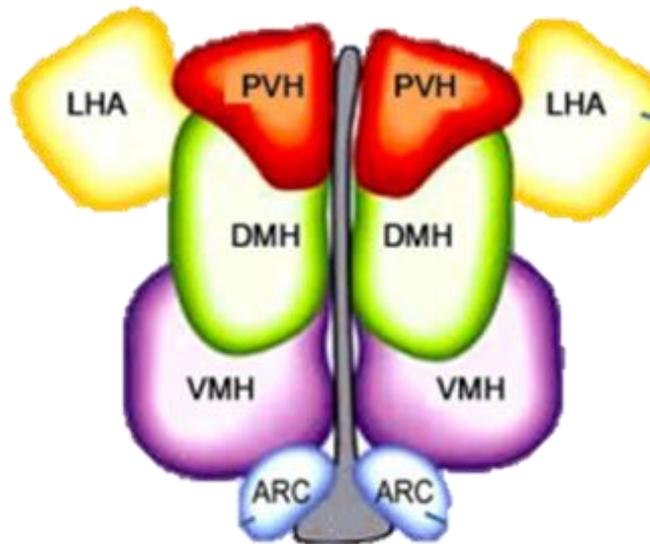


Figura 2. Núcleos hipotalámicos. El hipotálamo está formado por varios grupos de neuronas interconectadas entre sí que se localizan en varios núcleos, como el ARC (núcleo arcuato), DMH (núcleo dorsomedial), PVH (núcleo paraventricular), VMH (núcleo ventromedial) y LHA (área hipotalámica lateral) (Martinez *et al.*, 2016).

El ARC integra las señales que proporcionan información acerca del balance energético, a través de dos grupos separados de neuronas que ejercen funciones opuestas. El primer grupo se localiza en la porción lateral del ARC, sintetiza péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC), incluyendo las formas “a” y “b” de la hormona estimuladora de melanocitos (Farooqi *et al.*, 2002). Estas neuronas son activadas por diferentes señales hormonales periféricas como la leptina, la insulina o la glucosa circulante, que ejercen efectos anorexigénicos tras su activación, ante un estímulo de alimentación, a través de receptores que se distribuyen y en las células hipotalámicas para reducir la ingesta de comida y aumentar el gasto energético (Figura 3). La comunicación del sistema periférico con el sistema nervioso se coordina mediante la integración de estas señales hormonales y metabólicas, como ya se había mencionado anteriormente. Dichas señales, junto con las señales sensoriales y las respuestas a factores ambientales, se integran a nivel SNC con el fin de modular la ingesta y el gasto energético (Williams & Fruhbeck, 2009). En específico, la leptina y la insulina modulan la homeostasis de energía y los niveles de glucosa en sangre a través de sus efectos a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo. Se han identificado mutaciones en roedores y en seres humanos que afectan a la acción anoréxica de la leptina, las cuales implican defectos a nivel de su receptor, a los péptidos derivados de la POMC o al receptor MC4R. Animales o seres humanos que presentan estas mutaciones muestran incremento en la ingesta de alimento, por lo que todas estas moléculas constituyen dianas potencialmente terapéuticas (Brüning *et al.*, 2000; Farooqi *et al.*, 2003).

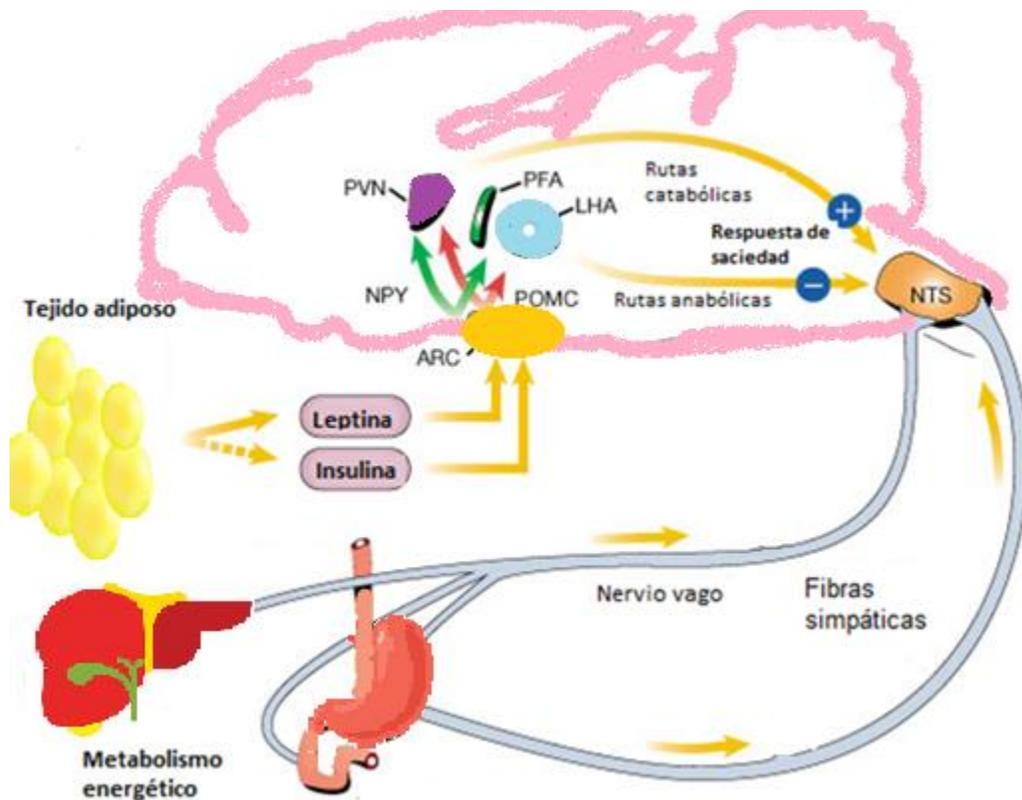


Figura 3. Señales metabólicas y neuronales en el núcleo arcuato. La leptina y la insulina estimulan una vía catabólica (neuronas POMC/CART) e inhiben una vía anabólica (neuronas NPY/AgRP) que se origina en ARC. Estas vías se proyectan al PVN y LHA, donde hacen conexiones con las vías autonómicas centrales que proyectan a los centros autónomos que procesan señales de saciedad. Las señales relacionadas con la saciedad mediadas por el hígado y del tracto gastrointestinal se transmiten a través del nervio vago y las fibras simpáticas al núcleo del tracto solitario (NTS), donde se integran con la señal hipotalámica (Michael *et al.*, 2000).

El segundo grupo de neuronas del ARC se encuentra en su porción medial y sintetiza NPY y la proteína relacionada con el Agouti (AgRP). El NPY es considerado en la actualidad como el más potente inductor del apetito. La inyección de este neuropéptido en los ventrículos cerebrales o en el hipotálamo de la rata estimula la ingesta, disminuye el gasto energético e incrementa la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado y del tejido adiposo, produciendo obesidad. Por su parte, la AgRP es un potente antagonista de los receptores de melanocortina, potenciando la ingesta de alimento y el peso corporal. Los niveles en sangre de este neuropéptido están elevados en los sujetos obesos (Hoggard *et al.*, 2004). Además,

se ha demostrado que la sobreexpresión del gen AgRP en roedores aumenta notablemente la ingesta y promueve obesidad. Las neuronas del ARC que expresan NPY y AgRP son mediadas positivamente por la grelina y se inhiben, a su vez, por las señales anorexigénicas de la leptina, la glucosa y la insulina. Se ha demostrado que los receptores de leptina (LepRs) en neuronas POMC aumentan el gasto energético, lo que resulta en una reducción del peso corporal independiente de los cambios en la ingesta de alimentos.

Por otra parte, los LepRs en las neuronas POMC son necesarios para la regulación de la glucosa (Sohn & Williams, 2012). En un estudio reciente se identificó que tan sólo el 12% de las neuronas POMC expresan el receptor de leptina, mientras que el 58% corresponde a las neuronas AgRP. En contraste, el receptor a insulina se expresa de manera muy similar en las neuronas POMC y AgRP, representando el 64% y 55%, respectivamente (Yeo *et al.*, 2017).

La importancia de las hormonas y los mecanismos de detección de nutrientes en el SNC que controlan la homeostasis de la glucosa son un punto clave para entender la regulación energética. Las neuronas específicas que median el control de la homeostasis y su relevancia fisiológica siguen siendo estudiadas. No obstante los estudios en su conjunto hasta ahora sugieren que, en respuesta a un aumento agudo de nutrientes, el cerebro desencadena respuestas metabólicas periféricas para disminuir los niveles de glucosa en plasma y mantener el balance energético (Lam *et al.*, 2009).

La insulina y la leptina regulan la ingesta de alimento y gasto energético mediante la activación de sus receptores de manera diferencial. En primer lugar, la insulina accede al cerebro principalmente desde la periferia (células β pancreáticas), a la barrera hematoencefálica, puede difundirse también a través del torrente sanguíneo en las regiones circumventriculares, e incluso hay algunas pruebas limitadas que sugieren la posibilidad de síntesis de insulina *de novo* en el cerebro (Schechter *et al.*, 1998; Akintola & Heemst, 2015). El mecanismo de señalización de insulina para regular la homeostasis periférica de la glucosa parece implicar la activación de los canales de potasio sensibles a ATP (K/ATP). Se sugiere que la

fosforilación de PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) inducida por la proteína 3-fosfatidilinositol cinasa (PI3K), activa directamente los canales K/ATP en las neuronas POMC, aumentando la conductancia que hiperpolariza las neuronas y dando como resultado un fenotipo hiperfágico (Figura 4) (Lam *et al.*, 2009).

Por su parte, la leptina es sintetizada principalmente en el tejido adiposo; sin embargo, se ha demostrado la expresión del gen de la leptina en muchos otros tejidos, incluido el hipotálamo. La expresión del gen de la leptina en el hipotálamo y en el tejido adiposo debe regularse de forma coordinada. Algunos estudios sugieren que una restricción o sobrealimentación modifica la expresión de leptina en el hipotálamo que ejerce un efecto secundario sobre la concentración sérica de leptina (Sucajtyś-Szulc *et al.*, 2009). La leptina se une a los LepRs promoviendo la fosforilación de JAK2, que fosforila los residuos de tirosina intracelulares del receptor. Cada uno de estos residuos fosforilados recluta un conjunto exclusivo de moléculas de señalización río abajo, tales como factores de transducción de señales y activadores de la transcripción (STAT-3 y STAT-5), promoviendo la expresión de POMC (Figura 4). Sin embargo, el aumento de carbohidratos y lípidos durante el consumo descontrolado de alimento, como es el caso en la obesidad, conducen al almacenamiento de grasa que ya ha sido implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la leptina, potencialmente debido a la producción de moléculas de señalización derivadas o a la activación de vías intracelulares perjudiciales como estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico (ER), afectando principalmente a sus receptores y alterando así la señalización que se ha mencionado anteriormente (Unger y Orci 2000; López, 2016).

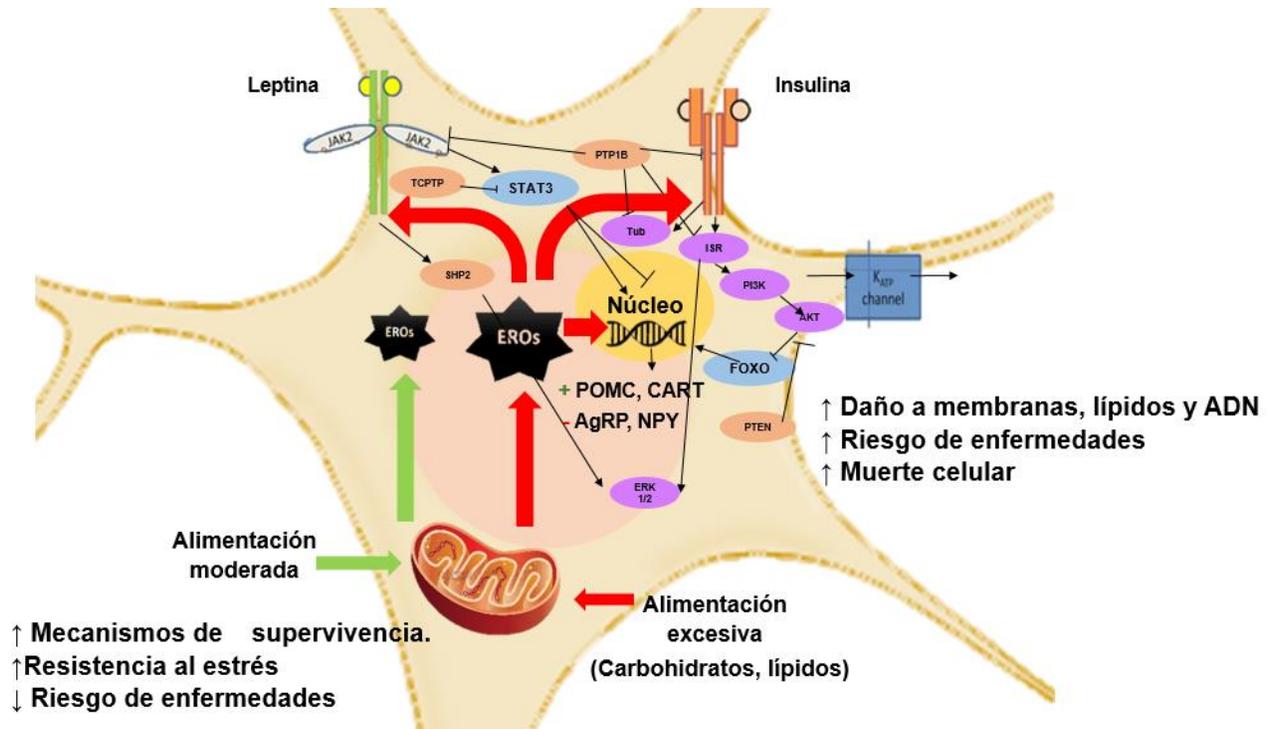


Figura 4. La acción de leptina e insulina en el núcleo arcuato hipotalámico. La leptina circulante se une a su receptor LepR, la tirosina cinasa asociada a la cinasa de Janus 2 (JAK2) se autofosforila y fosforila residuos de tirosina específicos a lo largo de la cola intracelular del LepR. La fosforilación permite el reclutamiento de la fosfatasa con homología al dominio 2 de la proteína Src (SHP2) que media la señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) río abajo y permite la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) que regula la transcripción de neuropéptidos clave implicados en la homeostasis energética. A diferencia de la señalización de la leptina, la unión de insulina a su receptor da lugar a la autofosforilación del receptor en los residuos de tirosina lo que permite el reclutamiento del efector IRS, que tras la fosforilación puede reclutar moléculas adaptadoras y mediar la señalización PI3K y ERK1/2. La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), Tub y proteína tirosina fosfatasa epsilon (RPTPe) inhiben la fosforilación de los receptores, la tirosina fosfatasa de células T (TCPTP) regula negativamente la señalización de leptina mediante la desfosforilación de STAT3. La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) antagoniza la señalización de PI3K inducida por insulina neuronal mediante la desfosforilación del fosfolípido PIP3 en PIP2, dando como resultado una disminución de la conductancia del canal K/ATP (Modificado de Tsou & Bence, 2012).

2.2. METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN EL HIPOTÁLAMO Y SU EFECTO EN LA FUNCIÓN NEURONAL

El cerebro utiliza preferentemente la glucosa como fuente de energía; sin embargo, algunas otras moléculas energéticas como la fructosa pueden ser utilizadas también, aunque el consumo de cantidades elevadas podría inducir alteraciones metabólicas semejantes a la resistencia a la insulina. La glucosa es internalizada en las células del SNC mediante transportadores, principalmente GLUT1, que no responde a la insulina y se expresa en la membrana celular, y GLUT4, sensible a la insulina (Heidenrich *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2014). Aunque la presencia de transportadores independientes de insulina es mayoritaria en células neuronales, se ha encontrado que el estrés oxidativo promovido por el exceso de glucosa está asociado con el mecanismo molecular de la disminución de la biosíntesis y la secreción de insulina, y contribuye al desarrollo de toxicidad de la glucosa (Kawahito *et al.*, 2009).

La toxicidad de la glucosa se deriva de la interacción de reacciones metabólicas y sus secuelas. Se proponen mecanismos como la ruta de los poliloles, que altera la osmolalidad y la permeabilidad celular. Además, la glucosa se oxida para formar radicales libres y carbonilos reactivos, mientras que la cadena respiratoria en la mitocondria que, ante un exceso de nutrientes, desencadena la formación de especies reactivas, principalmente el radical superóxido (O_2^-) que finalmente desencadenan estrés oxidativo y nitrosativo. Finalmente, la modificación de rutas que alteran proteínas y su función como la ruta de las hexosaminas y la glicación, que provoca la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) (Figura 5) los cuales pueden inducir cambios celulares a través de los receptores RAGE, un receptor que propaga la disfunción celular en varios trastornos inflamatorios (Horal *et al.*, 2004; Nowotny *et al.*, 2015). La acumulación de fructosa puede también estimular la actividad de la vía de las hexosaminas, ya que la formación de glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y glutamina, esto a su vez conduce a la generación de más ERO y por tanto a acentuar aún más el desbalance redox (Tomlinson & Gardiner, 2008). Estudios

iniciales han demostrado que el aumento del consumo de glucosa y/o fructosa, por tiempo prolongado, promueve daño celular y modificaciones metabólicas con un efecto en el peso corporal, la resistencia a la insulina y una disminución cognitiva (Sharma & Gupta, 2001; Ryu & Cha, 2003). Los cambios subsecuentes dan lugar a la disminución del soporte neurotrófico, alteración de la excitabilidad y la integración adecuada de señales. A largo plazo se podría generar degeneración y muerte de células lo que conduce a otras fallas funcionales en el organismo, algunas de las cuales se relacionan con el metabolismo (Tomlinson & Gardiner, 2008).

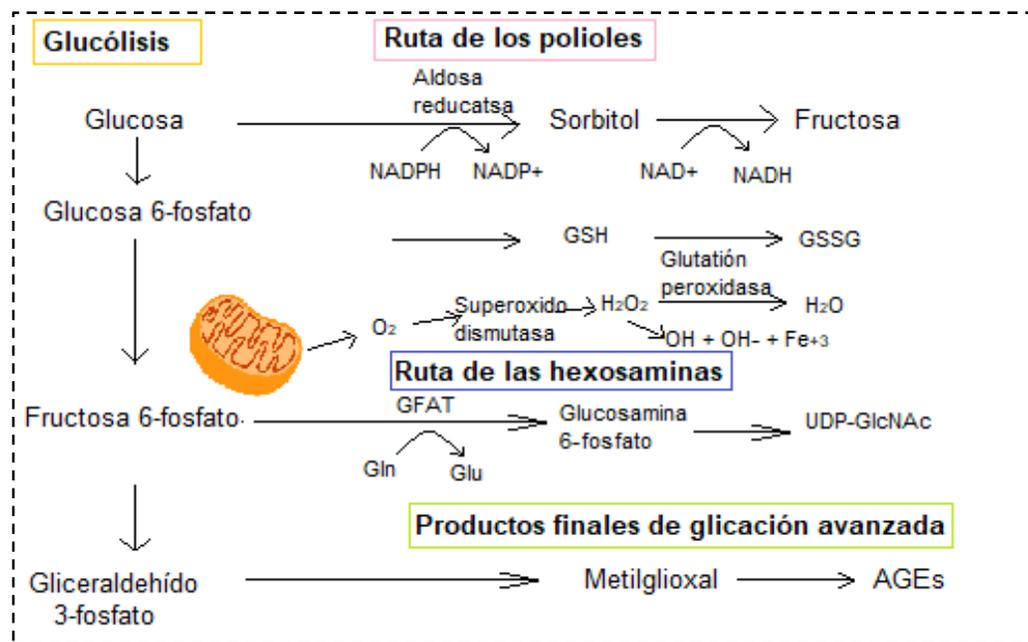


Figura 5. Vías metabólicas favorecidas por los niveles elevados de glucosa. El destino normal de la glucosa intracelular es la entrada en la glucólisis. Sin embargo, si los niveles altos de glucosa saturan la enzima hexocinasa, la glucosa es desviada a la ruta de los polioles, aumentando el consumo de NADPH. Esto puede comprometer el reciclaje del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), que afecta la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. Las mitocondrias se ven afectadas también produciendo el radical superóxido (O_2^-) y aunado al desbalance en la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se promueve la producción del radical hidroxilo. La vía glicolítica de la fructosa-6-fosfato puede impulsar la síntesis de uridina difosfato-N-acetilhexosamina (UDP-GlcNAc), que puede combinarse con serina y treonina en las proteínas intracelulares y comprometer la función de las proteínas (Vía hexosamina). El gliceraldehído-3-fosfato puede convertirse en metilglioxal, un ácido altamente reactivo, y formar productos de glicación sobre proteínas y otras macromoléculas. *Producto final de glicación avanzada (AGE) (Tomlinson & Gardiner, 2008).

2.3. EL INCREMENTO DE ÁCIDOS GRASOS DURANTE LA OBESIDAD PROMUEVE LIPOTOXICIDAD EN EL HIPOTÁLAMO

A diferencia de los carbohidratos o aminoácidos, los ácidos grasos (AG) representan el mayor aporte calórico para el metabolismo celular. Aunque se ha reportado que la oxidación de AG en el cerebro contribuyen únicamente en un 20% de la energía requerida, su participación en procesos de reparación, neurotransmisión y el desarrollo neuronal es esencial para el funcionamiento cerebral (Ebert *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2010). A nivel del sistema nervioso, los AG se obtienen principalmente a partir de la dieta debido a su habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica, o bien, a través de síntesis de *novo*; una vez dentro de las células gliales o las neuronas, los AG son esterificados y utilizados en diferentes procesos celulares (Le Foll *et al.*, 2009). En este concepto, uno de los principales reguladores de la síntesis de AG es la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK). Su actividad es modulada por diferentes estímulos y, una vez activa, fosforila e inhibe la acetil CoA carboxilasa (ACC), deteniendo la síntesis de malonil-CoA, que es un inhibidor fisiológico de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), enzima que cataliza el paso de AG desde el citoplasma al interior de la mitocondria y principal regulador de la β -oxidación (Figura 6) (McGarry & Brown, 1997).

El aporte de AG al SNC es relevante para un buen funcionamiento cerebral, principalmente debido a que el cerebro contiene un gran porcentaje de lípidos en sus membranas de mielina. Fisiológicamente, los AG de la dieta se almacenan en el tejido adiposo en forma de triglicéridos. Sin embargo, su acumulación en órganos no especializados incluidos, el hígado, el páncreas, el músculo esquelético y el SNC, genera toxicidad celular conocida como lipotoxicidad (Pellegrinelli *et al.*, 2016). En estudios realizados por Boden y colaboradores (1994) se demostró que algunos AG, como el ácido oleico, tenía efectos anorexigénicos; sin embargo, otros estudios muestran que este efecto anorexigénico se ve disminuido cuando se administran dietas hipercalóricas, lo que inducía el aumento de peso rápidamente (Pocai *et al.*, 2005).

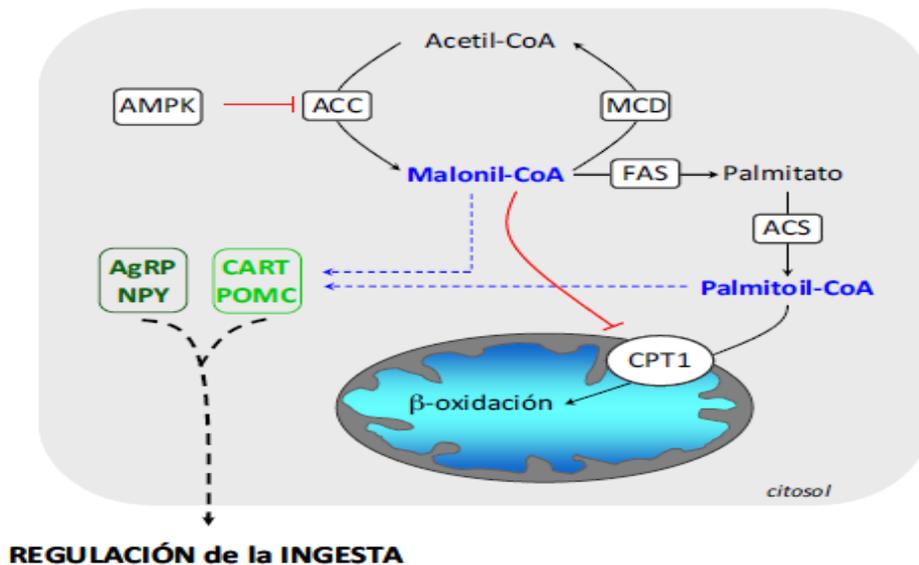


Figura 6. Metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo y regulación de la ingesta. Los niveles de malonil-CoA dependen de la actividad de tres enzimas ACC, MCD (malonil-CoA descarboxilasa) y FAS (ácido graso sintasa). La primera cataliza la síntesis de malonil-CoA, la segunda su degradación y la tercera utiliza esta molécula como sustrato para la síntesis de ácidos grasos (palmitato). El palmitato, esterificado a palmitoil-CoA por acción de la acil-CoA sintasa (ACS), puede ser internalizado en la mitocondria, donde es β -oxidado. Este paso es catalizado por CPT1. Esta enzima es inhibida por malonil-CoA, lo que permite mantener un equilibrio entre la síntesis y oxidación de grasas. Los metabolitos malonil-CoA y palmitoil-CoA se han propuesto como señalizadores de la regulación de síntesis de neuropéptidos implicados en el control de la ingesta (Dowell *et al.* 2005).

Datos experimentales han reportado que la exposición sostenida al exceso de AG en la dieta promueve daño celular asociado al estrés celular e inflamación, contribuyendo al desequilibrio energético presente en la obesidad (McFadden *et al.*, 2014). Sin embargo, el tipo de lípidos difieren en el grado de toxicidad, siendo que ciertas especies como las ceramidas y diacilgliceroles promueven efectos más tóxicos que los triacilglicéridos (Liu *et al.*, 2007; Virtue & Vidal-Puig, 2008). Además, existen reportes que demuestran que los AG saturados, consumidos ampliamente en las dietas occidentales, compuestas de un 28% de ácido palmítico (PA) y 42% de ácido oleico (OA), comparado con la dieta mediterránea rica en grasa insaturadas por sólo 13% de PA más 72% de OA, promueven una mayor prevalencia de obesidad, enfermedades del corazón y diabetes (Poon *et al.*, 2015).

2.4. ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN MODELOS DE SOBREALIMENTACIÓN

Se conoce que los AG inducen inflamación hipotalámica mediante la activación de la transducción de señales a través de receptor tipo “toll” (TLR4), lo que conduce a la activación del estrés del retículo endoplasmático (RE), la expresión de citocinas inflamatorias y eventualmente la apoptosis de las neuronas, contribuyendo en última instancia al desarrollo de la resistencia hormonal adipostática (Cintra *et al.*, 2012). Sin embargo, otros estudios han demostrado que los AG saturados no son promotores de los procesos inflamatorios en células neuronales (Choi *et al.*, 2010) y que incluso el estrés oxidativo promovido, ya sea por exceso de glucosa o AG, no tiene repercusiones importantes en el desarrollo de sobrepeso o muerte celular.

Por su parte, varios estudios sugieren que la inflamación hipotalámica se debe principalmente a las tensiones intracelulares locales causadas por nutrientes excesivos en el hipotálamo. Se ha demostrado en modelos animales que la administración intracerebral de glucosa o lípidos imitando la sobre nutrición, activa vías proinflamatorias relacionadas con la cascada del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), que conduce a la expresión de ciertos genes inflamatorios en el hipotálamo (Figura 7) (Zhang *et al.*, 2008; Kleinridders *et al.*, 2009; Cai & Liu, 2011). Sin embargo, en un escenario más fisiológico, la sobre nutrición crónica promueve la activación de inflamación que se relaciona con el exceso de las citocinas circulantes que, en su momento, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica cercana al hipotálamo y contribuir adicionalmente a la inflamación metabólica cerebral (Milanski *et al.*, 2009). La inflamación en el hipotálamo estimulada por la inducción hipercalórica puede ocurrir antes de manifestarse la obesidad u otros trastornos metabólicos, indicando que la inflamación hipotalámica en la obesidad y enfermedades relacionadas puede ser una respuesta a este estado inflamatorio.

Adicional al proceso inflamatorio generados durante la ingesta de dietas hipercalóricas se promueve también un incremento de la oxidación mitocondrial, con

la finalidad de procesar los nutrientes excesivos capturados por la célula. Tal aumento de la actividad mitocondrial requiere un aumento de la síntesis de proteínas citosólicas, lo que conduce a un estado de estrés en el RE que puede repercutir en la función mitocondrial y, por ende, en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que concluirá en condiciones patológicas en la célula (Murphy, 2009; Cai & Liu, 2011).

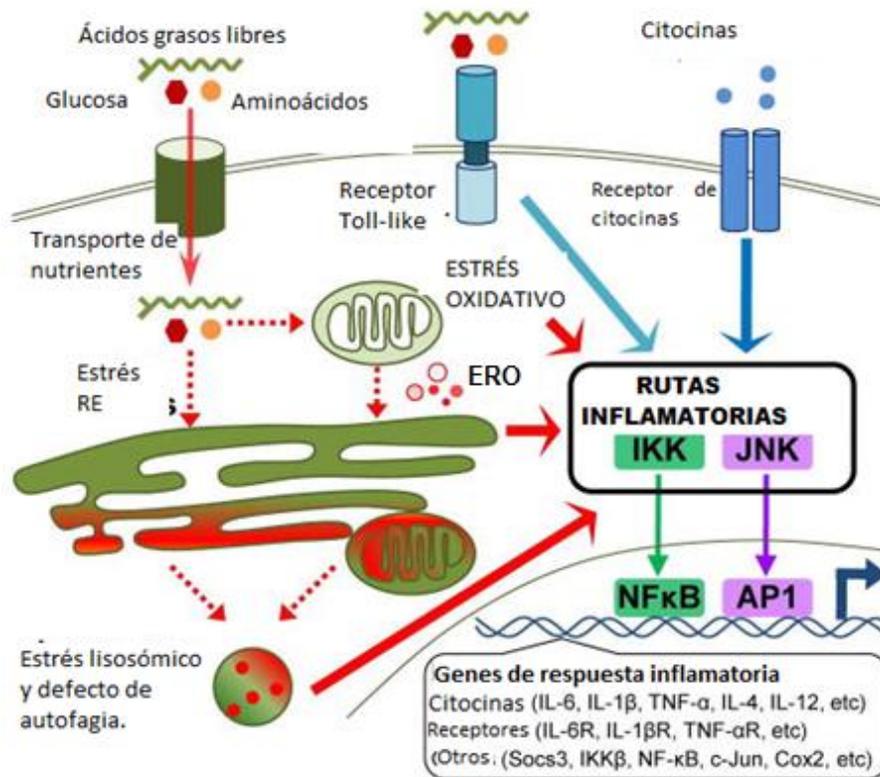


Figura 7. Cascadas de señalización de inflamación metabólica en el hipotálamo. Diversas alteraciones son inducidas bajo la condición crónica de la sobre nutrición. El estrés de organelos celulares promueve el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) que desencadenan el estrés del retículo endoplásmico (RE), que conducen a la acumulación de daño mitocondrial, dando como resultado un aumento del estrés lisosómico y un defecto de autofagia. Todas estas tensiones pueden conducir a la activación de los reguladores proinflamatorios, como la cinasa IκB (IKK) y la cinasa N-terminal de la c-Jun (JNK), que activa los factores de transcripción nuclear NF-κB o AP1 (proteína activadora 1) para iniciar la expresión génica de las moléculas de respuesta inflamatoria (Cai & Liu, 2011).

Para equilibrar la concentración de ERO, las células están provistas con diversos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Varias enzimas degradan directamente ERO, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). También existen diversos secuestradores no enzimáticos que intervienen en la desintoxicación de radicales libres entre los que se encuentran la vitamina E, ubiquinona o coenzima Q, Vitamina C y GSH (Clark, 2002). Éstos son considerados como marcadores del estado redox de las células permitiendo así evidenciar alteraciones en el equilibrio de ERO y, por lo tanto, de la integridad celular (Ho *et al.*, 2013).

Dada la importancia que tiene la mitocondria en la generación de energía en las células y su relación con el metabolismo de glucosa y oxidación de AG en el contexto de sobre nutrición, la disfunción mitocondrial podría dar lugar a disfunciones celulares relacionadas con daño metabólico. En su conjunto, con base en la evidencia científica del efecto de daño celular y metabólico relacionado con el incremento de azúcares y AG, en este proyecto se proponen modelos hipercalóricos que permitan evaluar alteraciones celulares y esclarecer el papel del estrés oxidativo y de la mitocondrial como blanco molecular de la sobrecarga de carbohidratos y AG en la regulación metabólica en una línea celular hipotalámica.

3. JUSTIFICACIÓN

La relevancia del sobrepeso y obesidad en el tema de salud pública y las enfermedades asociadas a este padecimiento, requiere de medidas de control que involucren a todo el sistema responsable de la regulación energética. Si bien existen ya estrategias que ayudan a modular la ingesta y el gasto de energía, como los son las dietas o programas de ejercicio constante, las estadísticas indican que los resultados son poco eficientes y en la mayoría de los casos no es persistente. Por lo que es necesario, además, tomar en cuenta el papel que desempeña el SNC, en específico el hipotálamo, para lograr una homeostasis energética completa y persistente. Por lo tanto, es necesario elucidar cuál es el papel específico que desempeña el sistema nervioso, y el efecto de los diferentes nutrientes y sus concentraciones en la función mitocondrial como blanco molecular de la sobrecarga de carbohidratos y ácidos grasos, y como consecuencia el estrés oxidativo como mecanismo de daño a biomoléculas en las células neuronales que afecta su funcionalidad, para tomarlo en cuenta en las estrategias de control.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño oxidativo y mitocondrial bajo estímulos hipercalóricos (glucosa, fructosa, ácidos palmítico y oleico) en células del hipotálamo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar el papel individual de la estimulación de glucosa, fructosa, ácidos palmítico y oleico sobre el desarrollo de estrés oxidativo en células del hipotálamo.
- Determinar el efecto de estímulos hipercalóricos sobre la función de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa.

5. METODOLOGÍA

5.1. CULTIVO CELULAR

Los cultivos celulares se derivan de la línea celular hipotalámica de ratón mHypoA-CLU192 (CELLutions Biosystems); se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma D5796) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L), suplementado con suero fetal bovino (FBS; biowest S1600) al 10 % (v/v) y 1 % de penicilina/ estreptomycin (10, 000 U/mL/10, 000 µg/mL) (Sigma P4333).

La línea celular se cultivó en medio esterilizado por filtración (filtro con diámetro de poro de 0.22 µm). Se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada al 5 % de CO₂ en frascos de cultivo de 75 cm². Para cosechar las células se agregó una solución de Tripsina-EDTA 1X estéril (Sigma 59428C) en cantidad suficiente para cubrir la monocapa celular (aproximadamente 2 mL). El desprendimiento de las células se monitoreó al microscopio, y se procedió a agregar medio de cultivo (DMEM 10 % SFB) para neutralizar la tripsina. La suspensión celular se centrifugó 5 min a 2,500 rpm y se descartó el sobrenadante, posteriormente se agregaron 10 mL de medio DMEM a la pastilla celular y se incubaron en la cantidad requerida para cada protocolo a 37 °C y 5 % CO₂.

5.2. ESTÍMULOS HIPERCALÓRICOS

Las soluciones de GLU y FRU se diluyeron en agua bidestilada estéril para obtener soluciones madre de 100 mM. Los AO y AP se disolvieron en etanol para obtener una solución madre hasta una concentración de 50 mM. Las soluciones madre se esterilizaron por filtración mediante un filtro con un diámetro de poro de 0.45 µm y posteriormente se diluyeron en medio DMEM hasta las concentraciones definidas en la Tabla 1. Para la estimulación con AG se adicionó la cantidad adecuada del lípido en una solución al 10% de albúmina de suero bovino (BSA), para una concentración final de BSA en pozo del 1%, para favorecer el transporte de los lípidos. Las células se suplementaron con los estímulos respectivos (Tabla 1) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. (Maccongonde *et al.*, 2015). Para todos los estímulos se realizaron triplicados técnico y experimentales.

5.3. VIABILIDAD CELULAR

5.3.1. ENSAYO MTT

La evaluación de la toxicidad, para determinar el rango de concentraciones viables para los ensayos, se llevó a cabo mediante la prueba de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT a formazán (compuesto de color azul) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, permitiendo determinar la funcionalidad de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, lo que además se corroboró con una prueba de cuantificación de proteína. Se colocaron cultivos con una concentración de 5×10^4 células que se expusieron a un gradiente de concentraciones (Tabla 1) de los compuestos previamente definidos (GLU, FRU, AO y AP) y el control ter-butilhidroperóxido (TBHP) durante 24 h (Silver y Erecińska, 1994; Gruetter *et al.*, 1998; Benoit *et al.*, 2009; Kaja *et al.* 2011; Park *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2015 Macongondé *et al.*, 2015). Posteriormente, se preparó una solución de MTT (1 mg/mL) en medio DMEM (sin GLU, suero fetal bovino ni L-glutamina), se añadieron 100 μ L a cada pozo en la placa y 100 μ L de medio DMEM sin GLU y la placa se incubó protegida de la luz durante 2 h a 37 °C, 5 % de CO₂. Finalmente, la placa se retiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán en dimetil sulfóxido (DMSO: Sigma D4540) y se leyó la absorbancia a 570 nm para su detección mediante VarioSkan LUX (Thermo Fisher).

El porcentaje de viabilidad se determinó en comparación al control:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Muestra}}{\text{Control}} * 100$$

Tabla 1. Concentraciones de GLU, FRU, AP, AO y TBHP a suplementar en cultivos celulares de hipotálamo.

Compuesto	Concentraciones (mM)				
GLU	15	35	55		
FRU	15	35	55		
AP	0.15	0.25	0.35		
AO	0.15	0.35	0.55		
TBHP	0.01	0.015	0.02	0.025	0.05
Control	25 mM GLU				

5.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE BCA

La cuantificación de proteína se realizó mediante un kit comercial (Thermo Fisher; 23225), basado en el método establecido por Smith (1985), donde el Cu^{+2} adicionado en solución de trabajo es reducido a Cu^{+1} por algunos aminoácidos presentes en las proteínas y posteriormente éste interactúa con el ácido bicinconínico formando un compuesto púrpura detectable a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de proteína correlaciona con el contenido celular y este parámetro funciona como normalizador de la viabilidad e indicador de la densidad celular. Para lo anterior, se colocaron cultivos con una concentración de 5×10^4 células que se expusieron a un gradiente de concentraciones (Tabla 1) de los compuestos previamente definidos y el control (TBHP) durante 24 h; se adicionó la solución de trabajo, se incubó durante 30 min y se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica. El porcentaje de proteína se expresó en base al control de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{[\text{proteína } \mu\text{g/mL muestra}]}{[\text{proteína } \mu\text{g/mL control}]} * 100$$

5.4. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

En la evaluación del estrés oxidativo se determinaron diferentes marcadores antioxidantes, tales como la concentración de glutatión reducido (GSH) a dos tiempos (24 y 48 h) y la liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además se determinó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX). Se incluyó como control positivo al inductor de estrés oxidativo TBHP en tres concentraciones (0.01, 0.02 y 0.025 mM).

5.4.1. CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

La concentración de GSH se determinó de acuerdo al método establecido por Ellman (1959), con modificaciones para la preparación del homogenado citosólico por Rahman y colaboradores (2007). El método se basa en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) por el grupo SH del glutatión. La concentración de GSH en las muestras se expresó en $\mu M/mg$ de proteína. Para la prueba se tomaron 150 μL del homogenado, se adicionaron 30 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y 120 μL de H_2O bidestilada estéril, se procedió a incubar durante 30 min en hielo y finalmente se realizó una centrifugación a 8,000 g por 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se colocaron 50 μL en una placa de 96 pozos, se adicionaron 80 μL de metanol puro, 150 μL de una solución amortiguadora Tris-EDTA (0.2 M-0.002 M; pH 8.2) y 20 μL de DTNB 2.45 mM para iniciar la reacción, se incubó durante 5 min y se realizó la lectura por espectrometría a una longitud de onda de 412 nm mediante VarioSkan LUX (Thermo Fishser). Las concentraciones se obtuvieron extrapolando a una curva de calibración realizada previamente. Los resultados finales se expresaron normalizando con el contenido de proteína en mg/mL de cada muestra (mM GSH/mg de proteína).

5.4.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

La medición de la actividad GPX se realizó en base a la metodología empleada por Paglia & Valentine (1967), la cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa (GR) y NADPH (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). Se evaluó la disminución de la absorbancia de NADPH medida a 340 nm durante la oxidación de NADPH a NADP, lo cual es un indicativo de la actividad GPX, debido a que es el factor limitante de la velocidad de la reacción acoplada. Para la determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos 100 μ L de solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA (50 mM/0.5 mM, pH 8), 50 μ L de la mezcla de GSH/GR (42 mM/10 U/mL), 50 μ L de muestra y 50 μ L de NADPH (5 mM). Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 μ L de hidroperóxido de cumeno (50 mM). Se realizaron 20 lecturas cada 6 s a 340 nm La lectura se realizó antes de 10 s transcurridos a partir de la adición de hidroperóxido de cumeno. La actividad de GPX se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta A_{340} \times DF}{6.22 \times V}$$

Notas:

$\Delta A_{340} = |A_{340}/\text{min, blanco}| - |A_{340}/\text{min, muestra}|$

6.22 = ϵ^{mM} para NADPH

DF = Factor de dilución

V = Volumen de la muestra

La actividad de GPX se expresa en nmol/min/mL ó Unidades/mL. Los resultados finales se expresaron normalizando la actividad con el contenido de proteína en mg/mL de cada muestra (Unidades/mg de proteína).

5.4.3. LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

Se utilizó Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidro- fenoxazina; Ultra Invitrogen) como una sonda fluorescente para la detección de H₂O₂ liberado en el medio (Drougard *et al.*, 2014). Primeramente, se prepararon las soluciones patrón de acuerdo a lo establecido por el fabricante y se comenzó el ensayo adicionando una mezcla de reacción a la suspensión celular [solución amortiguadora, DMSO, Amplex Red 1 mM y 20 U/mL de peroxidasa de rábano picante (HRP)], promoviendo la reacción con el H₂O₂, generando así un producto de oxidación rojo fluorescente: la resorufina. La intensidad de fluorescencia se detectó mediante VarioSkan a 590 nm. Los resultados se expresaron como la concentración en μ M de H₂O₂ obtenidos mediante una curva previamente realizada con concentraciones conocidas.

5.5. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Para determinar las alteraciones en la funcionalidad mitocondrial se plantearon dos pruebas; la relación ADP/ATP, la cual nos proporciona información acerca del estado energético de la célula; además, se midió el consumo de oxígeno a través de la aplicación de distintos sustratos e inhibidores de la cadena transportadora de electrones para localizar la afectación puntual.

5.5.1. RELACIÓN ADP/ATP

La relación ADP/ATP se determinó mediante el kit ADP/ATP Ratio Assay Kit (abcam®). Primeramente, se incubaron las células con un amortiguador de liberación de nucleótidos durante 5 min, mientras se adicionaron 100 μ L del reactivo para en la detección de ATP, y se leyó luminiscencia en unidades relativas de luminiscencia, RULA (A). Posteriormente, se adicionaron 50 μ L de las células previamente tratadas y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente, y se realizó la segunda lectura (B), se realizó otra lectura 2 minutos previos a la adición de la enzima convertidora de ADP (C), inmediatamente se añadieron 10 μ L del reactivo del ensayo de ADP se incubó durante 2 min y se tomó una cuarta lectura (D). Para calcular la relación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ADP/ATP ratio} = \frac{(D-C)}{(B-A)}$$

4.5.2. VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron utilizando un sensor de oxígeno. Todos los experimentos se llevaron a cabo en mitocondrias aisladas con niveles hiperoxigenados para evitar las limitaciones de difusión de oxígeno. Se llevó a cabo un protocolo de adición de sustrato secuencial para permitir la disección funcional del sistema de transporte de electrones: estado 4 de la respiración (respiración basal) se evaluó mediante la adición de glutamato (10 mM) y malato (2.5 mM); posteriormente, agregando ADP (100 μ M), se alcanzó la respiración del estado 3 (respiración máxima) para el Complejo I. Esto fue seguido por la adición de succinato (10 mM) logrando la máxima respiración acoplada del estado 3 con entrada de electrones paralela al complejo I y II. Se añadió CCCP (10 μ M) como desacoplante y obtener la respiración no mitocondrial. La velocidad de consumo de O₂ se obtuvo tomando en cuenta la pendiente (la cual representa la velocidad de consumo de O₂) de los parámetros obtenidos en el estado 3 o respiración activa, en presencia de exceso de sustrato y ADP, con velocidades máximas de consumo de O₂ y producción de ATP y la velocidad de consumo de O₂ en el estado 4 o respiración controlada, en presencia de exceso de sustrato y O₂, con velocidades bajas de consumo de O₂, donde las reacciones de transferencia de electrones son controladas vectorialmente por el potencial electroquímico de protones. Finalmente, se calcula el cociente entre el consumo de O₂ del estado 3/estado 4, restando la velocidad de consumo de oxígeno no mitocondrial. Este valor adimensional indica claramente el papel del ADP en la regulación del consumo de O₂ mitocondrial y provee un índice sensible para medir el grado de acoplamiento y la integridad de la membrana interna de las mitocondrias aisladas, con lo que se puede calcular la actividad específica; el número de nanoátomos consumidos por minuto por mg de proteína mitocondrial (nat O/min * mg prot).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño unifactorial, completamente aleatorizado, de cada uno de los compuestos; GLU, FRU, AP y AO con 3 concentraciones. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (DE). Para el análisis de datos se aplicó una ANOVA, seguida de una comparación de medias (bajo el mismo estímulo), mediante la prueba de Dunnett para los datos paramétricos y la prueba de Dunn para los datos no paramétricos, donde el control representó condiciones fisiológicas. Los resultados se tomaron como estadísticamente significativos con una $\alpha = 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el sistema estadístico JMP versión 11.0 (Copyright © 2013, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito evaluar el efecto diferencial de nutrientes como lo son GLU, FRU, AP y AO sobre el estrés oxidativo y función mitocondrial en una línea celular de hipotálamo. En específico, se pretendió elucidar el efecto tanto del tipo de nutriente como de su concentración en la activación de sistemas antioxidantes y alteraciones mitocondriales como indicadores de la integridad celular y la posible afectación de la señalización metabólica de las células neuronales inducidos por el estrés oxidativo.

5.5. VIABILIDAD CELULAR

Los resultados para los carbohidratos se muestran en la Figura 8, donde se puede observar que no existe una pérdida de viabilidad celular significativa para ninguna de las concentraciones de GLU suplementadas, y únicamente vemos disminuciones significativas de la viabilidad en la prueba de MTT en las concentraciones 35 y 55 mM de FRU (Figura 8. A); sin embargo, la viabilidad celular evaluada a través del contenido de proteína (BCA) a las diferentes concentraciones no tuvo variaciones significativas (Figura 8. B). De acuerdo a lo reportado por Namavar y colaboradores (2012), una dieta hipercalórica compromete principalmente la funcionalidad de las células neuronales, lo que vemos reflejado en la prueba de MTT, pero no así la cantidad neuronal, lo que se corrobora con la cuantificación de proteína.

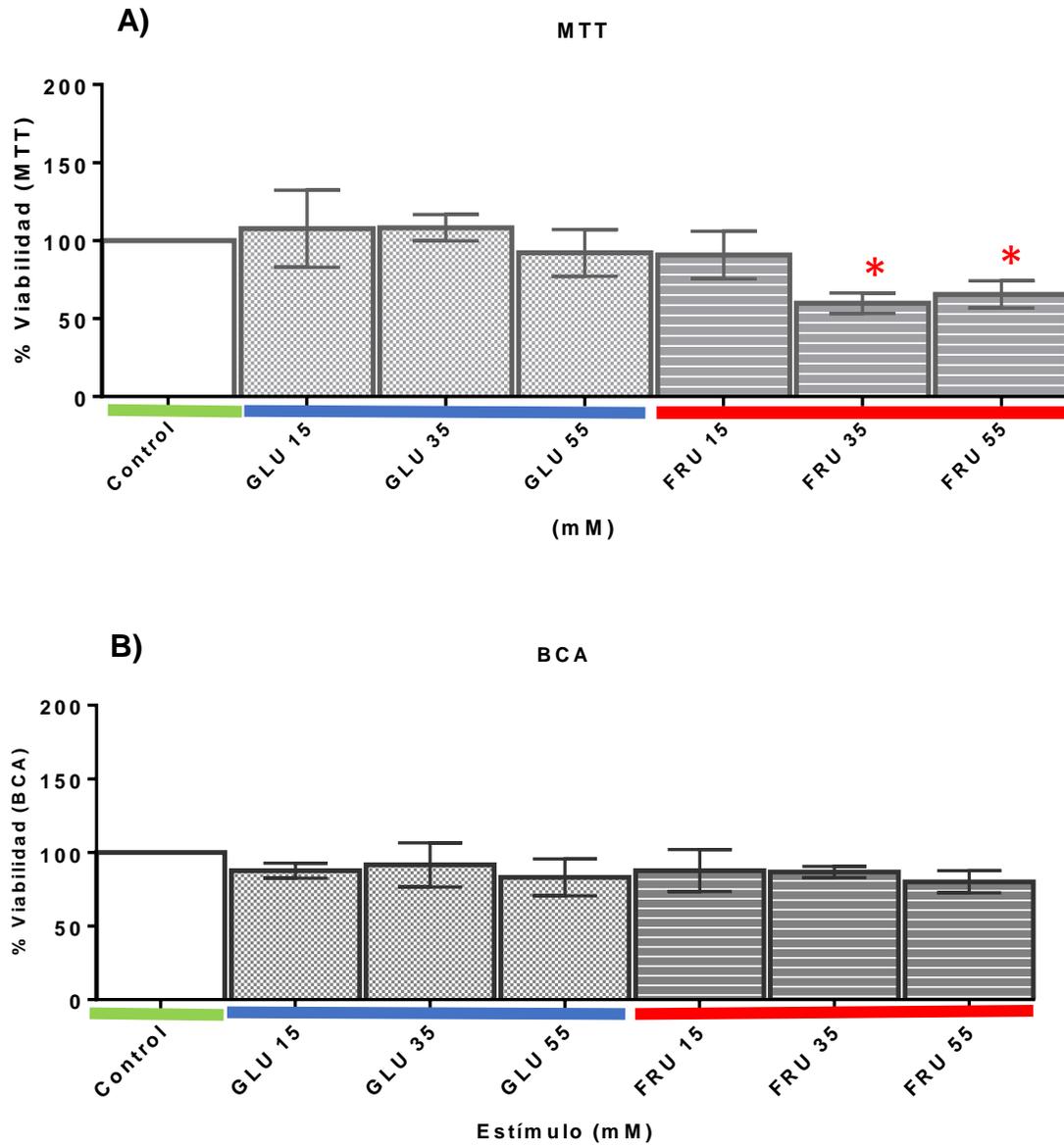


Figura 8. Efecto en viabilidad celular después de la estimulación con diferentes concentraciones de GLU (15, 35 y 55 mM) y FRU (15, 35 y 55 mM) durante 24 h. A) Prueba de MTT representando la funcionalidad celular y B) Prueba de BCA como indicador de la densidad celular. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control (25 mM de glucosa). El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett (* $\alpha = 0.05$).

En el caso de los AG se observan efectos muy diferentes, incluso entre ambos AG (Figura 9). Por un lado, las células suplementadas con el AP presentan una disminución de la viabilidad bajo las dosis más altas (0.20 y 0.25 mM), en la prueba de MTT (Figura 9. A), lo que concuerda con lo reportado anteriormente en otras líneas celulares, donde AP activa rutas apoptóticas en las células, mediadas por un proceso inflamatorio (Hsiao *et al.*, 2014). Si bien, la suplementación el AO promueve aparentemente la viabilidad celular (Figura 9. A), otros estudios plantean que estos resultados se deben a la inducción de biogénesis mitocondrial más que a un aumento en la viabilidad o proliferación celular. Este efecto ya ha sido evaluado para algunos AG y se asocia al aumento de β -oxidación, ATP y la fosforilación de AMPK que promueve la activación de reguladores clave en el metabolismo energético como PGC-1 α (coactivador de receptor gamma activado por proliferación de peroxisoma), activando así rutas de biogénesis mitocondrial (Cha *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2009).

En el contenido de proteína, en la prueba de BCA, no se observan disminuciones significativas respecto al control (Figura 9. B). De acuerdo a Moraes y colaboradores (2009), en un estudio realizado en un modelo animal de dieta alta en grasa no se presenta pérdidas de viabilidad mayores al 20 %, incluso a dosis límite de AG. Por lo anterior, se decidió incluir todas las concentraciones que mantengan al menos el 80 % de viabilidad.

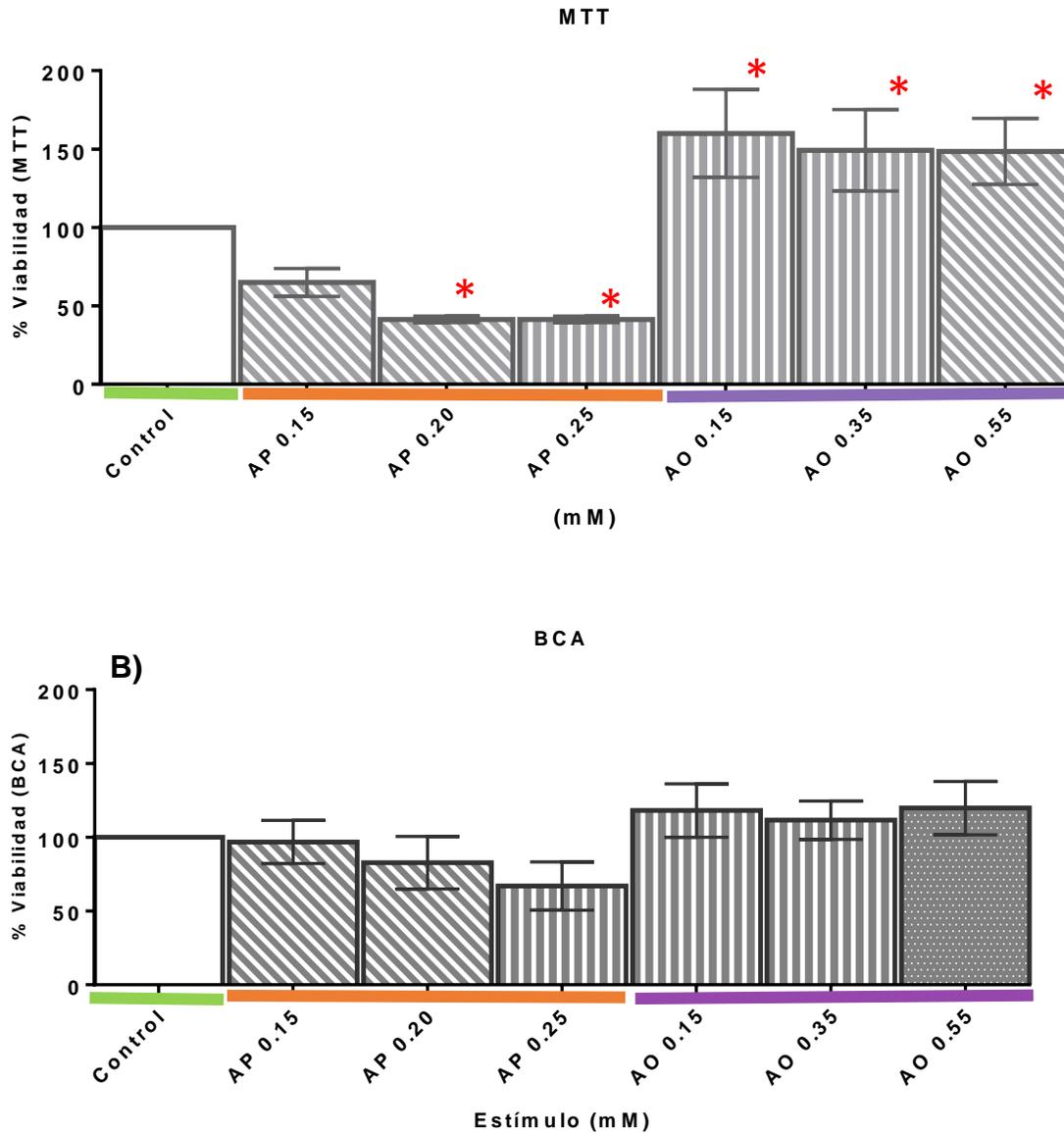


Figura 9. Efecto en la viabilidad celular después de la estimulación con diferentes concentraciones de AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM) y AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) durante 24 h. A) Prueba de MTT, representando la funcionalidad celular y B) Prueba de BCA, como indicador de la densidad celular. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control (25 mM de glucosa). El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett ($*\alpha = 0.05$).

Las concentraciones para el control positivo de estrés oxidativo (TBHP) se obtuvieron a partir de lo reportado en células epiteliales y de médula espinal (Maiwulanjiang et al., 2013; Zhao *et al.*, 2017) ajustando las concentraciones a suplementar. Obteniéndose un comportamiento similar al reportado por Maiwulanjiang y colaboradores (2013), donde se observa pérdida de la viabilidad a partir de 0.02 mM de TBHP (Figura 10. A), aunque, el contenido celular no se ve afectado hasta la concentración de 0,05 mM (Figura 10. B), por lo cual se puede concluir que se tiene principalmente una pérdida de la funcionalidad celular.

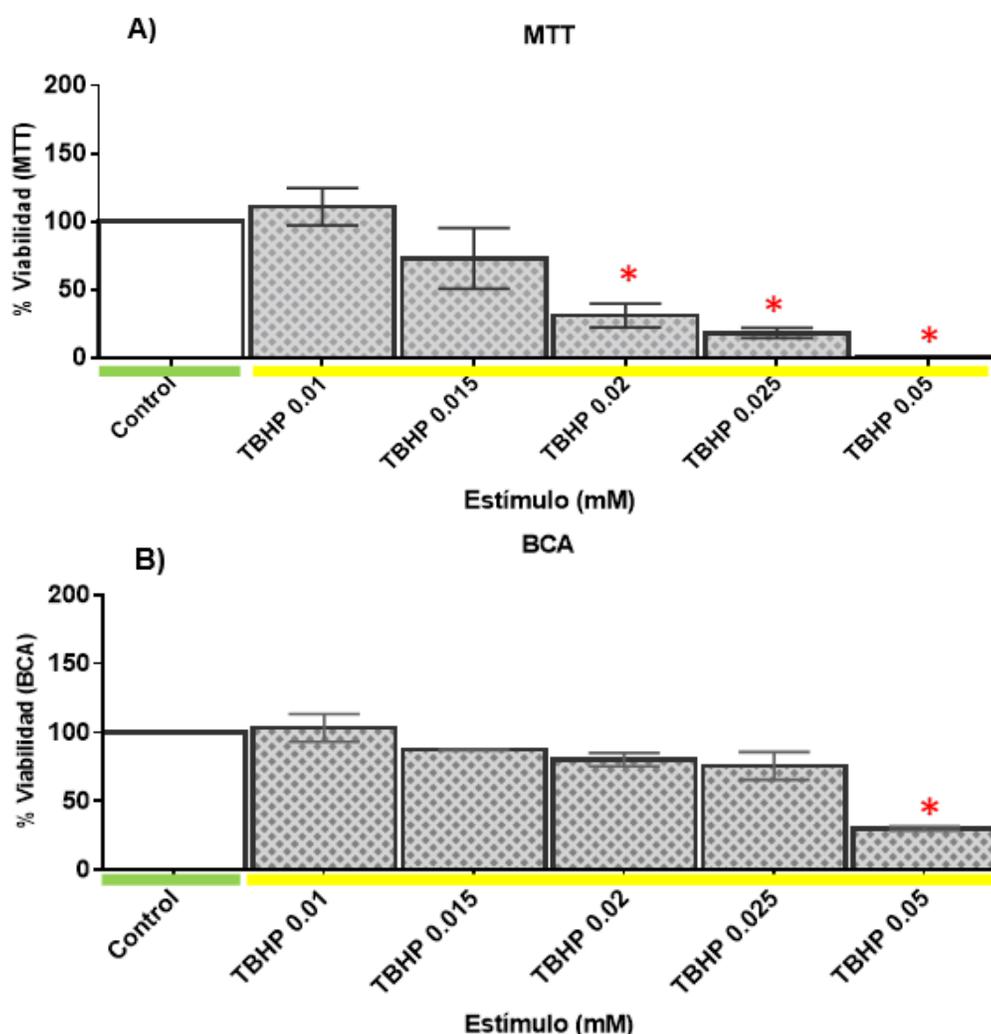


Figura 10. Efecto en la viabilidad celular, después de la estimulación con TBHP (0.01, 0.015, 0.02, 0.025 y 0.05 mM) durante 24 h. A) Prueba de MTT, representando la funcionalidad celular y B) Prueba de BCA, como indicador de la densidad celular. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control (25 mM de glucosa). El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett ($\alpha = 0.05$).

5.6. ACTIVACIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como indicador de estrés oxidativo se midieron los niveles de GSH, el cual es uno de los principales antioxidantes que neutraliza las ERO generadas por diversas fuentes intracelulares. En general, se observan niveles elevados de este marcador en las células estimuladas con la concentración más alta de todos los compuestos suplementados, lo que sugiere la inducción coordinada de los sistemas antioxidantes como un mecanismo de defensa ante un estrés oxidativo; aunque bajo condiciones de estrés oxidativo muy elevado o crónico se observan respuestas contrarias debido principalmente al agotamiento del sistema antioxidante. Kang y colaboradores (2002) evaluaron el efecto del TBHP en una línea celular de hepatocitos de ratón a diferentes tiempos y observaron una disminución de los niveles de GSH en las primeras 2 h del tratamiento, la cual se mantuvo por aproximadamente 2-3 h y, a partir de la 6 h, los niveles de GSH se elevaron nuevamente por encima del nivel basal hasta las 18 h, que es correspondiente al comportamiento o mecanismo de los compuestos suplementados.

5.6.1. CARBOHIDRATOS

5.6.1.1. AUMENTO EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO

En específico para las células estimuladas con los carbohidratos tenemos respuestas distintas entre los dos compuestos planteados (GLU y FRU). En el caso de las células suplementadas con GLU únicamente se observa un aumento significativo de aproximadamente 50 % en el nivel de GSH a la concentración más alta (55 mM). Por el contrario, para las células estimuladas con FRU se observan niveles elevados del 50-80 %, a las dos concentraciones más bajas suplementadas (15 y 35 mM) (Figura 11). Es probable que, a estas concentraciones, las células se encuentran en la etapa inicial de respuesta ante el estrés oxidativo promovido; mientras que, a la concentración más alta de GLU, las reservas celulares del sistema antioxidante ya se encuentran en la etapa de agotamiento (Kang *et al.*, 2002).

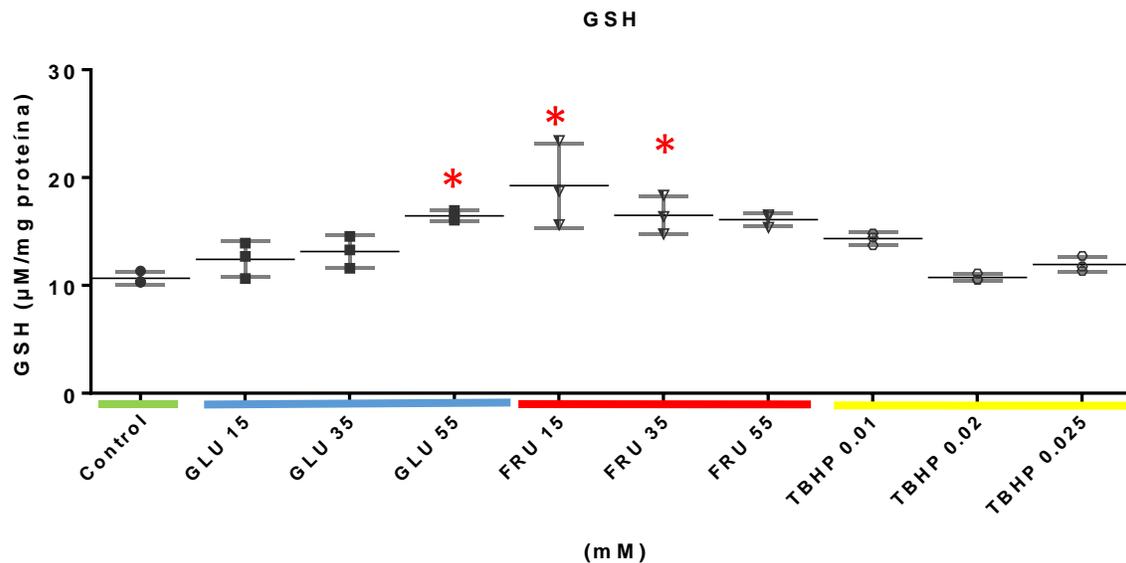


Figura 11. Nivel de glutatión reducido (GSH), después de la estimulación con GLU (15, 35 y 55 mM) y FRU (15, 35 y 55 mM), y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo. las diferentes concentraciones los compuestos durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett (* α = 0.05).

5.6.1.2. AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA

En cuanto a la actividad de la enzima GPX se observa un aumento en las células suplementadas con las concentraciones altas tanto de GLU y FRU, así como a la concentración más baja de FRU (Figura 12). De acuerdo a lo reportado por Mourmoura y colaboradores (2013), la actividad de la enzima en plasma aumenta hasta en un 21.5% en un modelo diabético inducido por dieta alta en grasas. Igualmente, Giordano y colaboradores (2015) reportan la misma tendencia en cardiomiocitos para la expresión del gen relacionado con la enzima en un modelo de hipoxia intermitente a corto plazo.

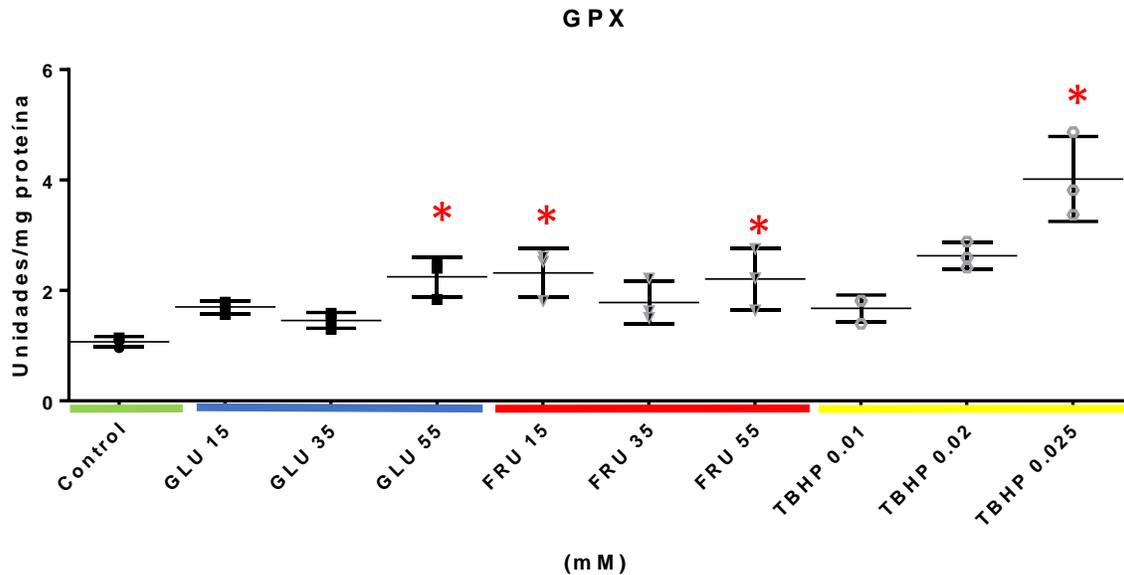


Figura 12. Inducción de la actividad de la enzima glutati3n peroxidasa (GPX), despu3s de la estimulaci3n con GLU (15, 35 y 55 mM), FRU (15, 35 y 55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducci3n de estr3s oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores est3n normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparaci3n con el control mediante la prueba de Dunnett ($*\alpha = 0.05$).

5.6.1.3. LIBERACI3N DE PER3XIDO DE HIDR3GENO

En la liberaci3n de H_2O_2 , no se observan variaciones significativas en ninguna de las concentraciones suplementadas, ni siquiera en los controles (Figura 13); esto probablemente se deba al tiempo de exposici3n y de medici3n del par3metro. Lim y colaboradores (2015) reportan que el tiempo de vida del per3xido ante la presencia de sistemas antioxidantes activos no rebasa las 6 horas, en este caso dada la actividad de la enzima GPX este compuesto podr3a no ser la v3a principal de formaci3n de especies reactivas. Adem3s, existen sistemas espec3ficos que se activan y se encargan de controlar el H_2O_2 intracelular; el sistema de las peroxirredoxina-sulfirredoxina (Laer *et al.*, 2016). La medici3n de estos sistemas se propone como parte de la continuaci3n de este proyecto para tener m3s evidencias de las rutas que se activan y esclarecer el papel del estr3s oxidativo.

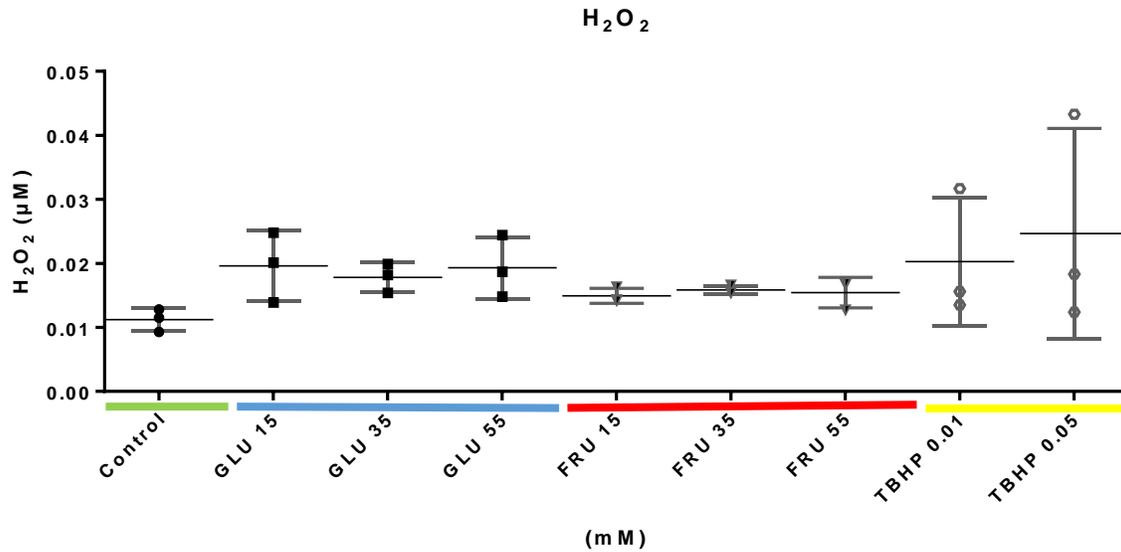


Figura 13. Concentración de peróxido de hidrogeno(H_2O_2), después de la estimulación con GLU (15, 35 y 55 mM), FRU (15, 35 y 55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunn ($*\alpha = 0.05$).

El método de detección utilizado es altamente sensible; sin embargo, tienen desventajas dado que la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) puede reaccionar con muchos sustratos celulares. También las sondas fluorescentes utilizadas tienen algunas limitaciones; por ejemplo, algunas sondas requieren tiempos de respuesta largos (30-60 min) o también se observa un aumento en la luminiscencia en presencia de citrato (Jacewicz *et al.*, 2017). Por lo anterior, se sugiere realizar las mediciones en una escala de tiempos más corta y controlar estos factores de interferencia.

5.6.2. ÁCIDOS GRASOS

5.6.2.1. ALTERACIÓN EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN REDUCIDO

Los niveles de GSH en las células aumentaron significativamente, alrededor de un 60%, ante la estimulación con las concentraciones más altas de AP y AO (0.25 y 0.55 mM, respectivamente), lo que da evidencia de una alteración en el estado oxidativo de la célula (Figura 14), probablemente debido al exceso de compuestos oxidables lo que promueve un desbalance en las ERO. Este comportamiento ya ha sido reportado por Ng y Say (2018), en una línea celular de neuroblastoma y glioblastoma, donde se observa un aumento en la generación de ERO dosis dependiente en rangos de concentración entre 0.1-0.5 mM de ambos AG (AP y AO).

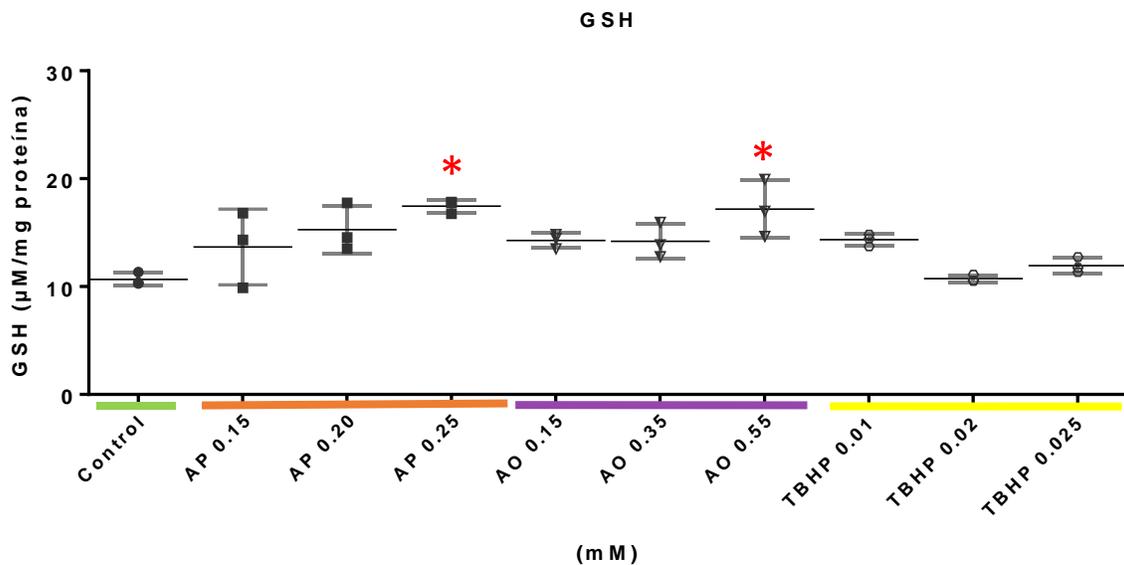


Figura 14. Nivel de glutatión reducido (GSH), después de la estimulación con AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM), AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett ($*\alpha = 0.05$).

5.6.1.2. AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad de la enzima GPX en las células se incrementa alrededor de un 80 % bajo la concentración más alta de AP, en comparación con el control. No obstante, no se observan variaciones significativas bajo ninguna de las concentraciones de AO (Figura 15). Si bien, Duval y colaboradores (2002) reportan la activación de sistemas antioxidantes como uno de los principales mecanismos de defensa ante la presencia de concentraciones elevadas de los AG insaturados, entre los que se encuentran AO, puede ser que no se hayan observado esas variaciones debido al tiempo de exposición. En el caso del AP, además del aumento de sustratos oxidables, se activan vías de señalización inflamatorias que exacerbaban la producción de ERO (Cai & Liu, 2011), por lo que es más notorio el aumento de estos indicadores, como el GSH y la actividad la enzima GPX, en las células suplementadas con AP.

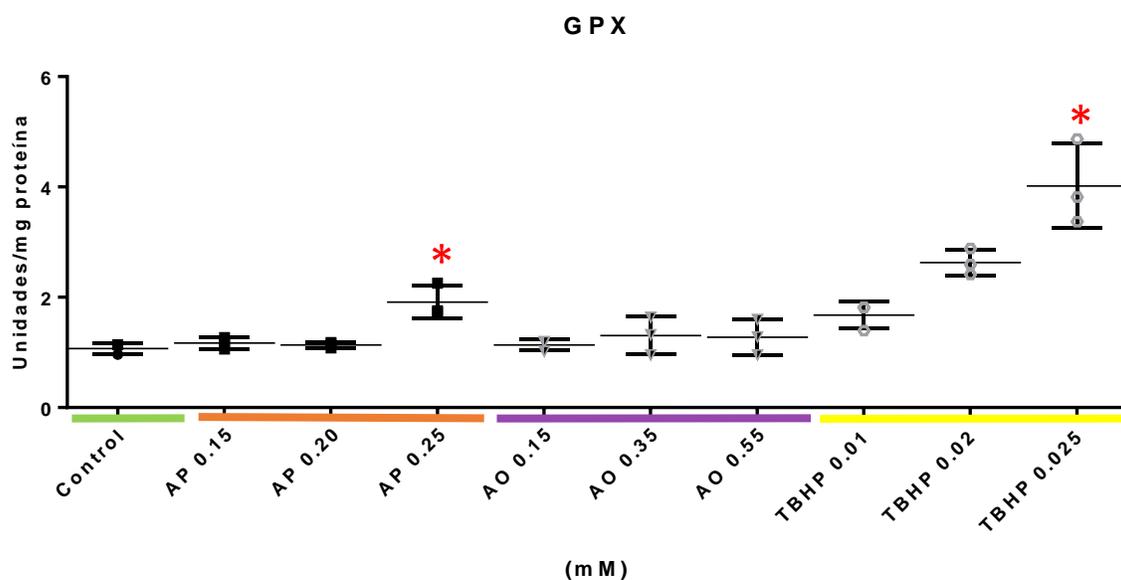


Figura 15. Inducción de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX), después de la estimulación con AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM), AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett ($*\alpha = 0.05$).

5.6.1.3. LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

En la liberación de H₂O₂, al igual que en las células suplementadas con los carbohidratos, no se observan variaciones significativas en ninguna de las concentraciones (Figura 16). Esto se atribuye igualmente al tiempo de exposición y de medición del parámetro, tomando en cuenta lo reportado por Lim y colaboradores (2015) acerca del tiempo de vida media del H₂O₂ ante la presencia de sistemas antioxidantes activos, lo cual se ve evidenciado en el aumento de la actividad de la enzima GPX.

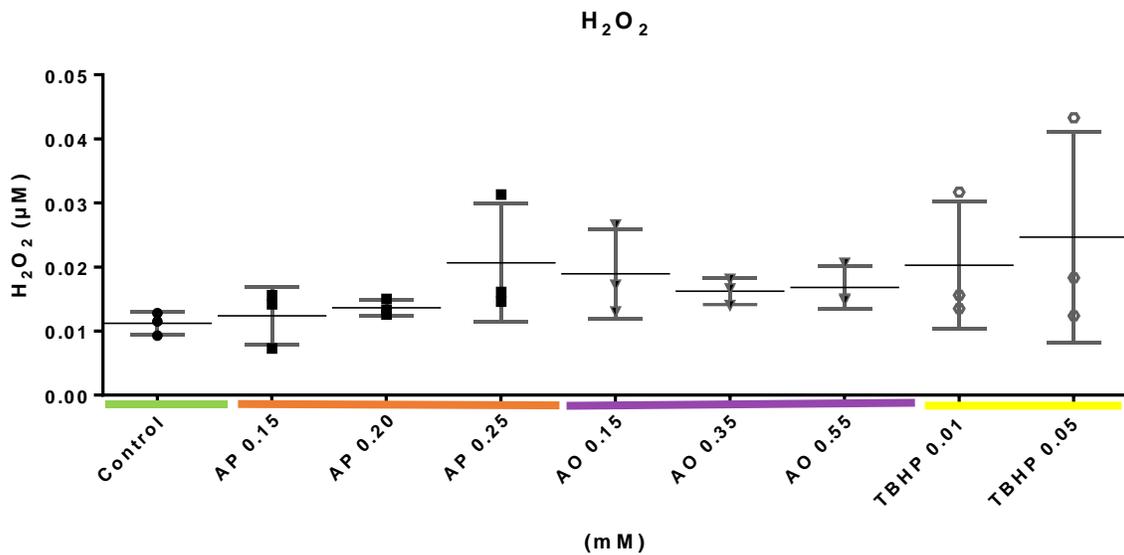


Figura 16. Nivel de peróxido de hidrógeno(H₂O₂), después de la estimulación con AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM), AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes ± DE. Todos los valores están normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunn (* α = 0.05).

5.7. EFECTO EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias juegan un papel central en el metabolismo energético. Además de la producción de ATP, las mitocondrias representan una de las principales fuentes de producción de ERO (De Mello *et al.*, 2018), como ya se había mencionado anteriormente. En este contexto se toman como parámetros indicadores de la funcionalidad mitocondrial, los niveles de ATP y ADP, así como el consumo de oxígeno, para evidenciar el efecto que tienen los diferentes nutrientes en esta vía y como afecta la actividad celular, específicamente en la función de la cadena transportadora de electrones (CTE).

5.7.1. CARBOHIDRATOS

5.7.1.1. AUMENTO EN LA RELACIÓN ADP/ATP

Considerando los resultados de esta relación (ADP/ATP), confirmamos que los compuestos ejercen un efecto directo en la concentración de ATP y ADP en las células, dependientes de la concentración, aunque de manera diferente para cada tipo (Figura 17). En el caso de las células estimuladas con GLU se observa un aumento en la relación de un 300-800 %. Este efecto ya ha sido reportado en linfocitos con altas concentraciones de glucosa (25 mM), donde se observó una reducción de un 60 % en la producción de ATP (Sakowicz-Burkiewicz *et al.*, 2013), similar a la disminución observada para las células suplementadas con el nivel más alto de GLU. Lo anterior se atribuye a diferentes vías, por ejemplo, la saturación de enzimas como la hexoquinasa o la piruvato deshidrogenasa, disminuyendo así el metabolismo oxidativo y desviando la vía probablemente a la producción de lactato, que es también una de las principales fuentes de energía de las células neuronales (Magistretti & Allaman, 2015). Es importante resaltar que esta disminución de energía tan marcada no parece tener un efecto directo en la viabilidad en las células estimuladas con GLU, pero podría afectar la funcionalidad celular.

Las células estimuladas con FRU presentan igualmente un aumento significativo de alrededor de un 300 % de la relación ADP/ATP en las concentraciones más altas (35 y 55 mM) y una disminución aproximada de 30 % de ATP. Evidencia en estudios realizados en hígado muestran que la FRU induce una depleción del fosfato libre y por ende una disminución en la formación de ATP. Además, los transportadores de FRU en las células neuronales se encuentran en menor proporción y su eficiencia de transporte es menor al de la GLU (Tappy & Le, 2010).

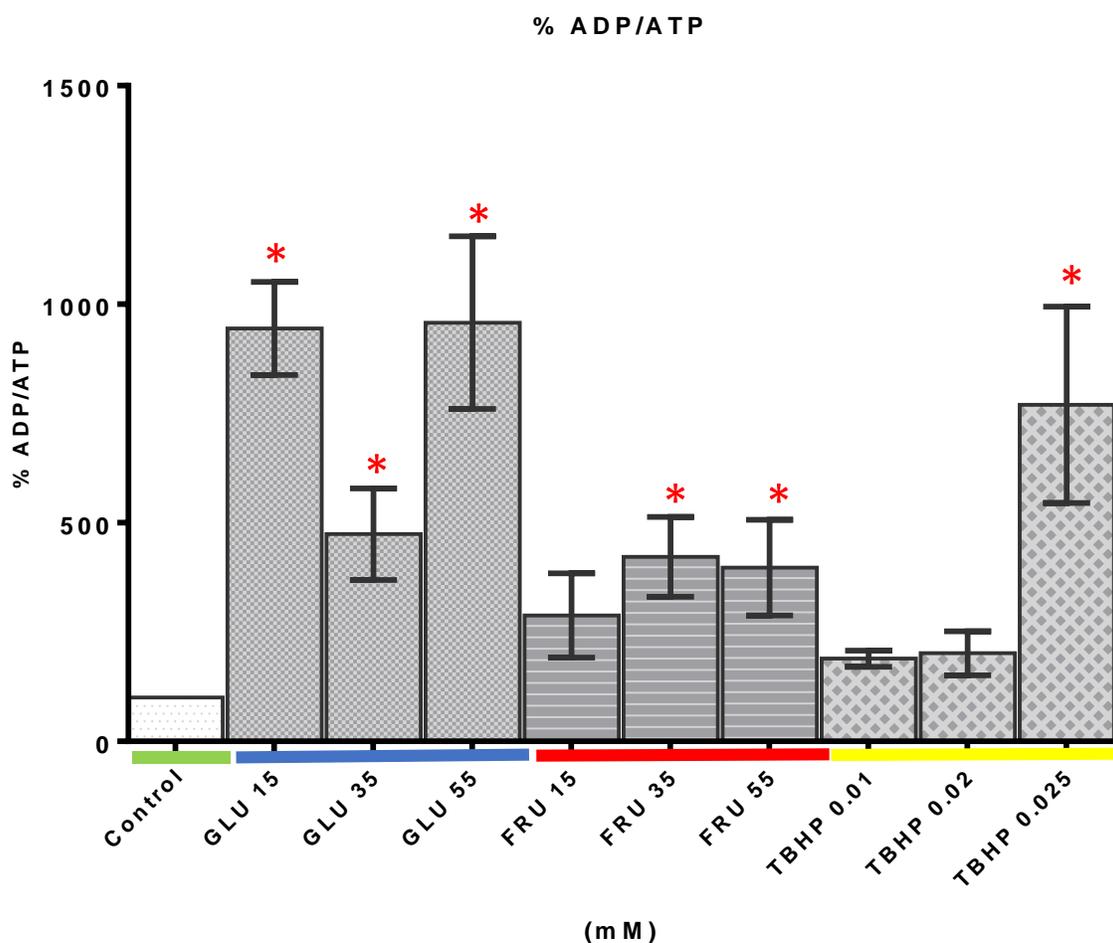


Figura 17. Relación ADP/ATP relativo al control después de la estimulación GLU (15, 35 y 55 mM), FRU (15, 35 y 55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett (* $\alpha = 0.05$).

5.7.1.2. VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO

Se realizó un análisis del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de cultivos de células suplementadas con las concentraciones de GLU y FRU previamente mencionadas. Se evaluaron dos combinaciones de sustratos glutamato-malato y succinato para valorar el funcionamiento de los principales complejos encargados de la alimentación de electrones de la CTE (Complejo I; NADH deshidrogenasa y complejo II; succinato deshidrogenasa).

Se puede observar que las células suplementadas con las concentraciones más altas de GLU (35 y 55 mM) muestran una disminución significativa en la respiración mitocondrial, tanto basal (Figura 18. A y B) como máxima (Figura 18. C y D). Esta disminución de la respiración suele asociarse a una disminución en la viabilidad; sin embargo, células suplementadas con altas concentraciones de GLU muestran viabilidad similar al control (25 mM), probablemente debido a la desviación del nutriente a vías anaerobias como la producción de lactato, sustrato que es utilizado ampliamente por células neuronales para su mantenimiento (Panov *et al.*, 2014).

La evaluación de las mitocondrias aisladas de las células suplementadas con FRU muestran disminuciones significativas (50-100 %) tanto para la respiración basal como máxima, incluso para el nivel más bajo suplementado (15 mM), en el caso de la respiración basal (Figura 18. A y B).

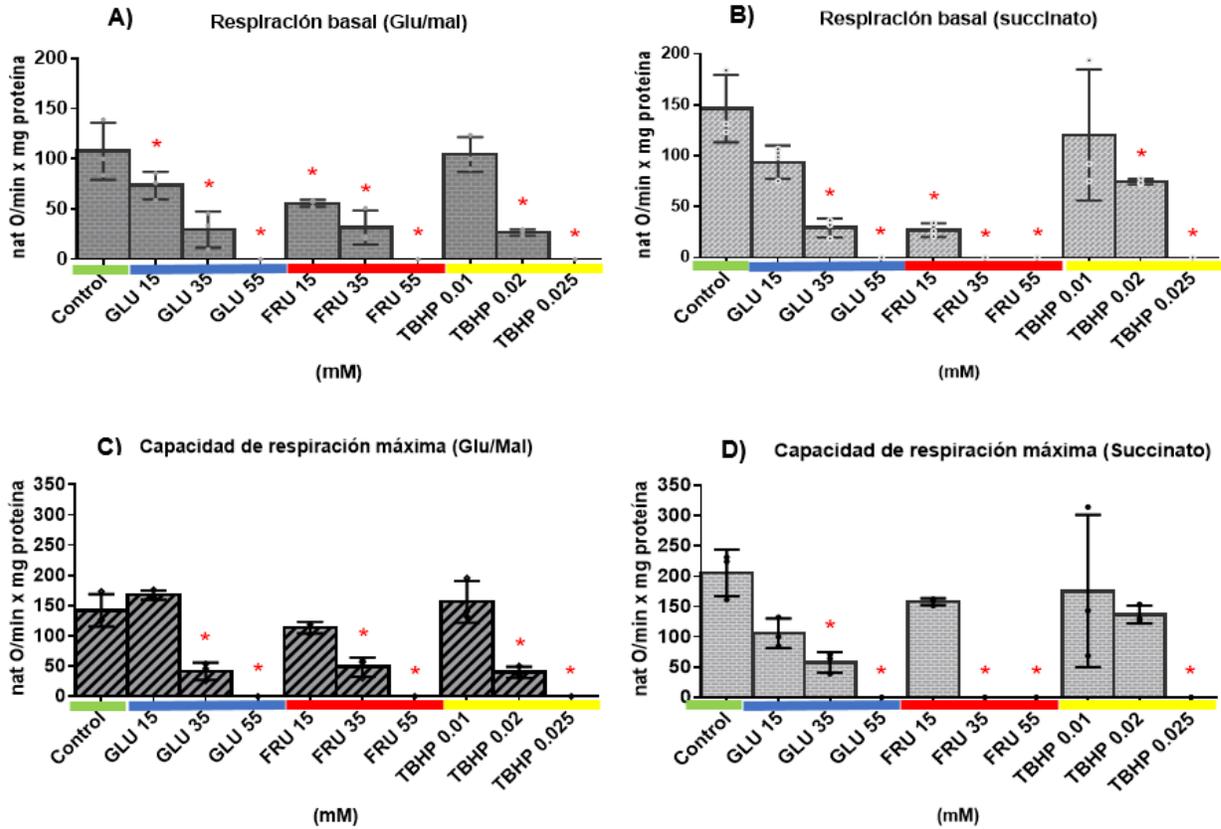


Figura 18. Efecto en el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cultivos celulares suplementados con GLU (15, 35 y 55 mM), FRU (15, 35 y 55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. A) Respiración basal, sustrato; glutamato-malato (10 mM:2.5 mM). B) Respiración basal, sustrato; succinato (10 mM). C) Respiración máxima glutamato-malato (10 mM:2.5 mM) + ADP (100 μ M). D) Respiración máxima, succinato (10 mM) + ADP (100 μ M).

5.7.2. ÁCIDOS GRASOS

5.7.2.1. AUMENTO EN LA RELACIÓN ADP/ATP

En las células estimuladas con los AG la relación ADP/ATP aumenta directamente con la concentración de ambos AG (Figura 19). En el caso de la suplementación con AP, el aumento en la relación ADP/ATP también correlaciona con la viabilidad celular, que es uno de los parámetros que se determina en base a los niveles de ATP en la célula. Sin embargo, para aquellas células tratadas con AO esta alteración no afecta la viabilidad celular, efecto similar al que observamos bajo los estímulos con GLU. Se ha reportado que los AG aumentan el consumo de oxígeno y reducen drásticamente el contenido de ATP cuando se agregan a los medios de incubación con piruvato o lactato, que correlaciona con un exceso de nutrientes, respaldando un deterioro de la generación de energía a concentraciones elevadas (Schönfeld & Wojtczak, 2016).

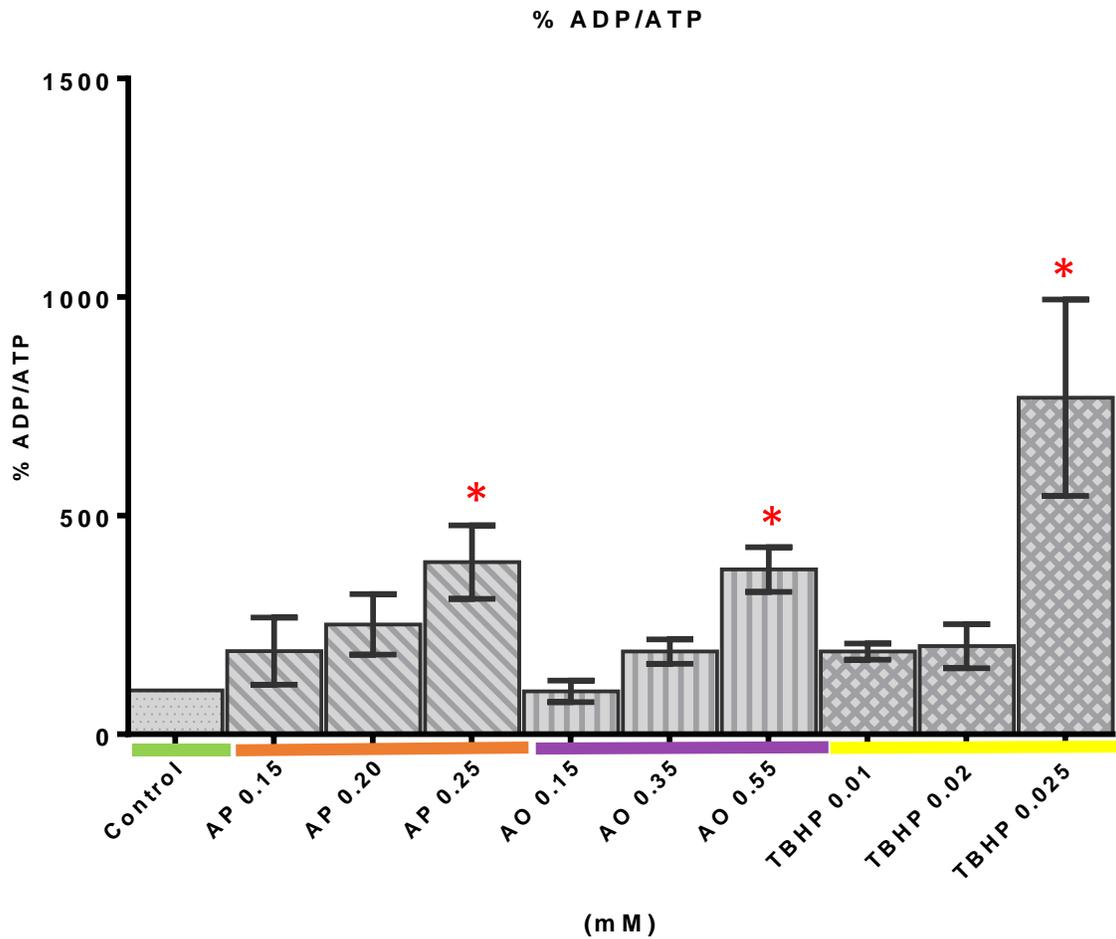


Figura 19. Relación ADP/ATP relativo al control después de la estimulación con AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM), AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. Los datos se presentan como la media de 3 experimentos independientes \pm DE. Todos los valores están normalizados respecto al control. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con el control mediante la prueba de Dunnett ($*\alpha = 0.05$).

5.7.2.2. VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO

Se realizó un análisis del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de cultivos de células suplementadas con AP y AO. Se evaluaron dos combinaciones de sustratos glutamato-malato y succinato para valorar el funcionamiento de los complejos I y II de la CTE.

Se puede observar que las células suplementadas con las concentraciones más altas de AP y AO (0.20, 0.25 y 0.35, 0.55 mM, respectivamente) muestran una disminución significativa en la respiración mitocondrial (Figura 20. A y C), afectando principalmente al complejo I (Deshpande & Heinzle, 2004; Vazquez *et al.*, 2015). Esta disminución se asocia a una pérdida de viabilidad para el caso de AP, sin embargo, este comportamiento es distinto en las células suplementadas con AO, las cuales a pesar de esta disminución en el consumo de oxígeno y de la relación ADP/ATP muestran un aumento en la viabilidad celular en la prueba de MTT (funcionalidad). Esto probablemente se debe a la activación de vías que como la de AMPK que promueven biogénesis mitocondrial y proliferación celular, teniendo como principal fuente de energía el AMP (Watt *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2013).

La respiración mitocondrial no se ve afectada al alimentar la CTE mediante el complejo II (succinato) con ninguno de los AG evaluados (Figura 20. B y D). De acuerdo a lo reportado por Nsiah-Sefaa & McKenzie (2016) la oxidación de AG es la principal fuente de FADH₂, por lo cual se tiende a eficiente el transporte de electrones a través de esta vía para desfogar el exceso.

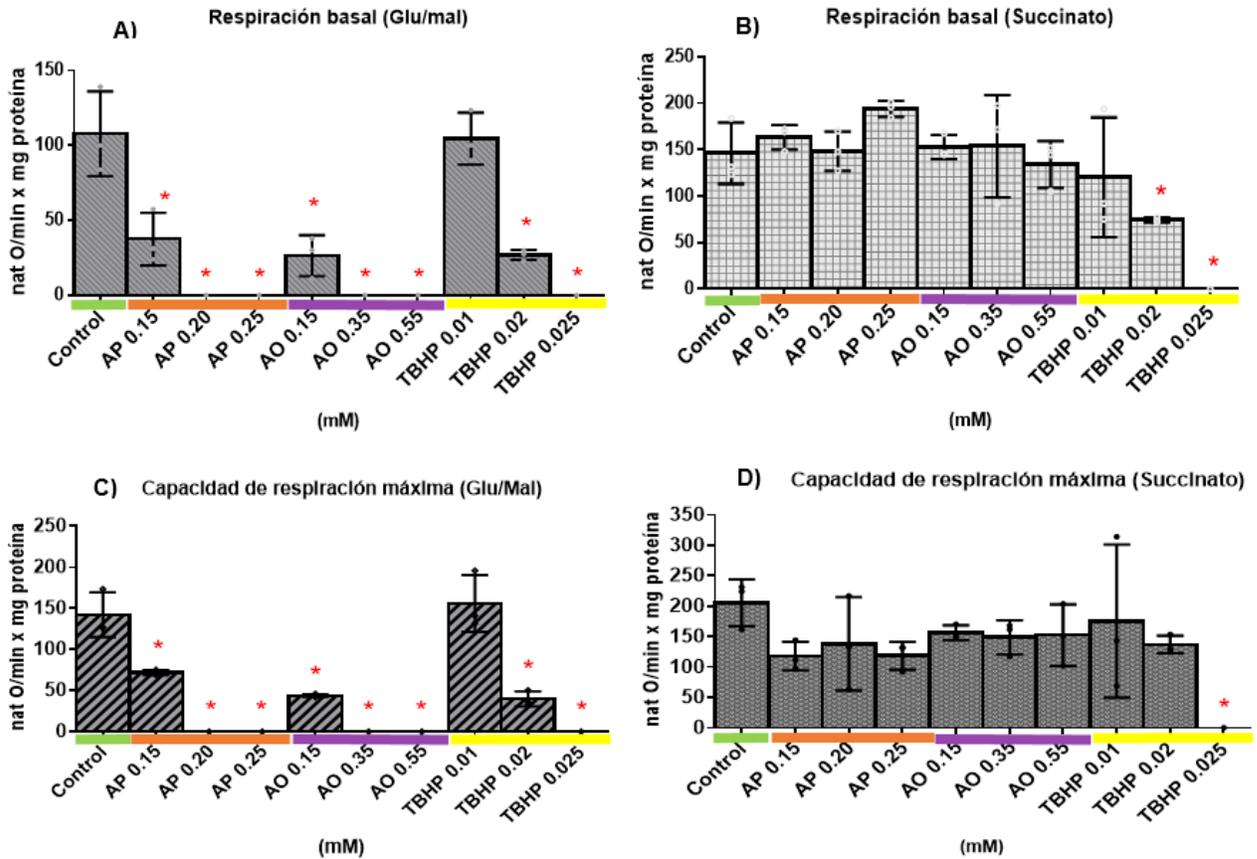


Figura 20. Efecto en el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de cultivos celulares suplementados con AP (0.15, 0.20 y 0.25 mM), AO (0.15, 0.35 y 0.55 mM) y TBHP (0.01, 0.02 y 0.025 mM) como control positivo de inducción de estrés oxidativo durante 24 h. A) Respiración basal, sustrato; glutamato-malato (10 mM:2.5 mM). B) Respiración basal, sustrato; succinato (10 mM). C) Respiración máxima glutamato-malato (10 mM:2.5 mM) + ADP (100 μ M). D) Respiración máxima, succinato (10 mM) + ADP (100 μ M).

6. CONCLUSIONES

Cada nutriente tiene un efecto distinto a nivel celular, siendo los carbohidratos lo que afectan principalmente la función mitocondrial, lo cual se ve reflejado en el aumento de la relación ADP/ATP y la disminución en el consumo de oxígeno. Como resultado de estas alteraciones se observa el incremento en los sistemas antioxidantes, como la concentración de GSH y la actividad de la enzima GPX, principalmente a concentraciones altas tanto de GLU como de FRU. Sin embargo, existen diferencias entre ambos compuestos, lo que indica desviaciones de las rutas metabólicas distintas y, por lo tanto, alteraciones en el funcionamiento celular. Para el caso de los AG se observa una alteración a nivel mitocondrial, principalmente a nivel del complejo I, en las células bajo el estímulo de las concentraciones más altas tanto de AP como de AO. No obstante, únicamente aquellas células suplementadas con concentraciones altas de AP muestran un incremento significativo en la activación de sistemas antioxidantes y pérdida de la viabilidad. Mientras que, la suplementación con AO particularmente activa los sistemas antioxidantes a la concentración más alta planteada. Además, se observa un aumento en la funcionalidad celular independiente de la concentración del compuesto AO, lo que se ha relacionado en otros estudios con la activación de vías de biogénesis mitocondrial y proliferación celular.

La mitocondria representa un blanco molecular importante del exceso de carbohidratos y AG, donde la concentración de los mismos puede o no ser determinante dependiendo del tipo de compuesto. Particularmente, carbohidratos como la fructosa promueven alteraciones a nivel mitocondrial importantes originando un proceso oxidativo que podría ser la causa de un mal funcionamiento celular que desencadenaría en alteraciones metabólicas.



Figura 21. Resumen del efecto de estímulos hipercalóricos en viabilidad, estado oxidativo y función mitocondrial en células hipotalámicas.

7. REFERENCIAS

- Akintola, A. A., & van Heemst, D. (2015). Insulin, aging, and the brain: Mechanisms and implications. *Frontiers in Endocrinology*, (6)1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00013>
- Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J. V., & Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *Journal of Clinical Investigation*. 93(6), 2438-46.
- Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., & Kahn, C. R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289 (5487), 2122 LP-2125. <http://science.sciencemag.org/content/289/5487/2122.abstract>
- Cai, D., & Liu, T. (2011). Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1243, E1-39. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06388.x>
- Cha, S., Rodgers, J. T., Puigserver, P., Chohan, S., & Lane, M. D. (2006). Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15410–15415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607334103>
- Choi, S. J., Kim, F., Schwartz, M. W., & Wisse, B. E. (2010). Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 298(6), E1122-30. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00006.2010>
- Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Moraes, J. C., Pauli, J. R., Morari, J., de Souza, C. & T., Velloso, L. A. (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic Inflammation in obesity. *PLOS ONE*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030571>
- Clark S. F. (2002). The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutrition in Clinical Practice*. 17, 5–17.

- De Mello, A. H., Costa, A. B., Engel, J. D. G., & Rezin, G. T. (2018). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, 192, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.019>
- Deshpande, R. R., & Heinzle, E. (2004). On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Molecules and Cells*. 39(1): 46-52. <https://doi.org/10.1023/B>
- Dowell, P., Hu, Z., & Lane, M. D. (2005). Monitoring energy balance: Metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 515–534. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074027>
- Drougard, A., Duparc, T., Brenachot, X., Carneiro, L., Gouazé, A., Fournel, A., & Knauf, C. (2014). Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(4), 557–73. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5182>
- Ebert, D., Haller, R. G., & Walton, M. E. (2003). Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5928–35. <https://doi.org/23/13/5928> [pii]
- Farooqi, S. I., Tim, C., & Stephen, O. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *New England Journal of Medicine*, 348(12), 1085–1095. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022050>
- Farooqi, S. I., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., & O’Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1093–1103. <https://doi.org/10.1172/JCI200215693>
- Giordano, C., Lemaire, C., Li, T., Kimoff, R. J., & Petrof, B. J. (2015). Autophagy-associated atrophy and metabolic remodeling of the mouse diaphragm after

short-term intermittent hypoxia. *PLoS ONE*, 10(6), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131068>

Heidenrich, K. a, Gilmore, P. R., & Garvey, W. T. (1989). Glucose transport in primary cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 22(4), 397–407.
<https://doi.org/10.1002/jnr.490220405>

Heuvel, J. K., Eggels, L., Fliers, E., Kalsbeek, A., Adan, R. A. H., & la Fleur, S. E. (2014). Differential modulation of arcuate nucleus and mesolimbic gene expression levels by central leptin in rats on short-term high-fat High-sugar diet. *PLOS ONE*, 9(1), e87729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087729>

Ho, E., Galougahi, K., Liu Ch., Ravi Bhindi, R. & Figtree G., (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*. 1(1) 483-491.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>.

Hoggard, N., Johnstone, A. M., Faber, P., Gibney, E. R., Elia, M., Lobley, G., Stubbs, R. J. (2004). Plasma concentrations of alpha-MSH, AgRP and leptin in lean and obese men and their relationship to differing states of energy balance perturbation. *Clinical Endocrinology*, 61(1), 31–39.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02056.x>

Horal, M., Zhang, Z., Stanton, R., Virkamäki, A., & Loeken, M. R. (2004). Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: Involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 70(8), 519–527.
<https://doi.org/10.1002/bdra.20056>

Hsiao, Y. H., Lin, C. I., Liao, H., Chen, Y. H., & Lin, S. H. (2014). Palmitic acid-induced neuron cell cycle G2/M arrest and endoplasmic reticular stress through protein palmitoylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20876–20899.
<https://doi.org/10.3390/ijms151120876>

- Jacewicz, D., Siedlecka-Kroplewska, K., Drzeżdżon, J., Piotrowska, A., Wyrzykowski, D., Tesmar, A. & Chmurzyński, L. (2017). Method for detection of hydrogen peroxide in HT22 cells. *Scientific Reports*, 7, 45673. <https://doi.org/10.1038/srep45673>
- Jo, Y.-H., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., & Chua, S. (2008). Oleic acid directly regulates POMC Neuron excitability in the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, 101(5), 2305–2316. <https://doi.org/10.1152/jn.91294.2008>
- Jones, L. L., McDonald, D. A., & Borum, P. R. (2010). Progress in lipid research acylcarnitines: Role in brain. *Progress in Lipid Research*, 49(1), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.004>
- Kang, K. W., Lee, S. J., Park, J. W., & Kim, S. G. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 1001–1010. <https://doi.org/10.1124/mol.62.5.1001>
- Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 15(33), 4137-42. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4137>
- Kleinridders, A., Schenten, D., Könner, A. C., Bengt F. B., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F. T., Medzhitov, R. & Brüning, J. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid induced leptin resistance and diet-induced obesity. *National Institutes of Health*, 144(5), 724–732. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Korner, J., Woods, S. C., & Woodworth, K. A. (2017). Regulation of energy homeostasis and health consequences in obesity. *The American Journal of Medicine*, 122(4), I-CO4. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.01.003>
- Laer, K. Van, & Dick, T. P. (2016). The Roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and in signal transduction utilizing natural and engineered peroxiredoxins as Intracellular peroxide reporters. *Molecules and cells*. 39(1): 46-52. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2349>

- Lam, C. K. L., Chari, M., & Lam, T. K. T. (2009). CNS Regulation of glucose homeostasis. *Physiology*, 24(3), 159 LP-170. <http://physiologyonline.physiology.org/content/24/3/159.abstract>
- Lam, T. K. T., Pocai, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., & Rossetti, L. (2005). Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nature Medicine*, 11(3), 320–7. <https://doi.org/10.1038/nm1201>
- Le, Foll, C., Irani, B. G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. A., & Levin, B. E. (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), R655 LP-R664. <http://ajpregu.physiology.org/content/297/3/R655.abstract>
- Lim, J. H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J. E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., Xiang, Y. K. & Puigserver, P. (2013). Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. *The Journal of biological chemistry*, 288(10), 7117-26.
- Lim, J. B., Huang, B. K., Deen, W. M., & Sikes, H. D. (2015). Analysis of the lifetime and spatial localization of hydrogen peroxide generated in the cytosol using a reduced kinetic model. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.009>
- Liu, L., Zhang, Y., Chen, N., Shi, X., Tsang, B., & Yu, Y. (2007). Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 117(6), 1679–1689. <https://doi.org/10.1172/JCI30565DS1>
- López, M. (2016). Hypothalamic Leptin Resistance: From BBB to BBSome. (E. Héon, Ed.), *PLoS Genetics*. 12(5), e1005980.. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005980>
- Macongonde, E. A., Vilela, T. C., Scaini, G., Gonçalves, C. L., Ferreira, B. K., Costa, N. L. F. & Schuck, P. F. (2015). Evaluation of the in vivo and in vitro effects of

- fructose on respiratory chain complexes in tissues of young rats. *Disease Markers*. 2015, 312530. <https://doi.org/10.1155/2015/312530>
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron*, 86(4), 883–901. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>
- Maiwulanjiang, M., Zhu, K. Y., Chen, J., Miernisha, A., Xu, S. L., Du, C. Y. Q. & Tsim, K. W. K. (2013). Song Bu Li decoction, a traditional Uyghur medicine, protects cell death by regulation of oxidative stress and differentiation in cultured PC12 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(687958) 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/687958>
- Martinez de Morentin, P. B., Urisarri, A., Couce, M. L., & Lopez, M. (2016). Molecular mechanisms of appetite and obesity: a role for brain AMPK. *Clinical Science*, 130(19), 1697–1709. <https://doi.org/10.1042/CS20160048>
- McFadden, J. W., Aja, S., Li, Q., Bandaru, V. V. R., Kim, E. K., Haughey, N. J. & Ronnett, G. V. (2014). Increasing fatty acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS ONE*, 9(12), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115642>
- McGarry, J. D., & Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry*. 244(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E. & Velloso, L. A. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience*, 29(2), 359 LP-370. <http://www.jneurosci.org/content/29/2/359.abstract>
- Minor, R. K., Chang, J. W., & Cabo, R. De. (2009). Play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Molecular Cell*, 29(1), 79–88.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.044>.Hungry

Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R. & Velloso, L. A. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005045>

Mourmoura, E., Vial, G., Laillet, B., Rigaudière, J. P., Hininger-Favier, I., Dubouchaud, H., Demaison, L. (2013). Preserved endothelium-dependent dilatation of the coronary microvasculature at the early phase of diabetes mellitus despite the increased oxidative stress and depressed cardiac mechanical function *ex vivo*. *Cardiovascular Diabetology*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-49>

Namavar, M. R., Raminfard, S., Jahromi, Z. V., & Azari, H. (2012). Effects of high-fat diet on the numerical density and number of neuronal cells and the volume of the mouse hypothalamus: a stereological study. *Anatomy & Cell Biology*, 45(3), 178–84. <https://doi.org/10.5115/acb.2012.45.3.178>

NCI. (2010). Hypothalamus. Consultado el 17 de enero, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022790/?figure=1>

Nicklas, J. M., Huskey, K. W., Davis, R. B., & Wee, C. C. (2012). Successful weight loss among obese U.S. adults. *American Journal of Preventive Medicine*, 42(5), 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2012.01.005>

Ng, Y.-W., & Say, Y.-H. (2018). Palmitic acid induces neurotoxicity and gliatotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ*, 6, e4696. <https://doi.org/10.7717/peerj.4696>

Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194–222. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>

Nsiah-Sefaa, A., & McKenzie, M. (2016). Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience Reports*, 36(2), e00313–e00313. <https://doi.org/10.1042/BSR20150295>

- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719 LP-721. <http://science.sciencemag.org/content/164/3880/719.abstract>
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity : how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *PLOS Biology*, 6(9), 1075–1088. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3933-4>
- Paglia, D.E. & Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70, 158–169
- Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., & Lyakhovich, V. (2014). Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *BioMed research international*, 2014, 472459. <https://doi.org/10.1155/2014/472459>.
- Pocai, A., Lam, T. K. T., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Schwartz, G. J., Bryan, J. & Rossetti, L. (2005). Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production. *Nature*, 434(7036), 1026–1031. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03439>
- Poon, K., Alam, M., Karatayev, O., Barson, J. R., & Leibowitz, S. F. (2015). Regulation of the orexigenic neuropeptide, enkephalin, by PPAR δ and fatty acids in neurons of the hypothalamus and forebrain. *Journal of Neurochemistry*, 135(5), 918–931. <https://doi.org/10.1111/jnc.13298>
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Ryu, M.-H., & Cha, Y.-S. (2003). The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(3), 312–318.

<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2003.36.3.312>.

- Sakowicz-Burkiewicz, M., Grden, M., Maciejewska, I., Szutowicz, A., & Pawelczyk, T. (2013). High glucose impairs ATP formation on the surface of human peripheral blood B lymphocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(7), 1246–1254. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.008>
- Schechter, R., Yanovitch, T., Abboud, M., Johnson, G., & Gaskins, J. (1998). Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. *Brain Research*, 808(2), 270–278. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00842-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00842-7)
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, 57(6), 943–954. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>
- Sharma, M., & Gupta, Y. K. (2001). Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sciences*, 68(9), 1021–1029. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01005-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01005-5)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Sohn, J.-W., & Williams, K. W. (2012). Functional heterogeneity of arcuate nucleus pro-opiomelanocortin neurons: implications for diverging melanocortin pathways. *Molecular Neurobiology*, 45(2), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8240-6>
- Song, Z., Levin, B. E., McArdle, J. J., Bakhos, N., & Routh, V. H. (2001). Convergence of Pre- and Postsynaptic Influences on Glucosensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *Diabetes*, 50(12), 2673 LP-2681. <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/50/12/2673.abstract>
- Sucajtyś-Szulc, E., Goyke, E., Korczynska, J., Stelmanska, E., Rutkowski, B., &

- Swierczynski, J. (2009). Refeeding after prolonged food restriction differentially affects hypothalamic and adipose tissue leptin gene expression. *Neuropeptides*, 43(4), 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.05.001>
- Tappy, L., & Le, K.-A. (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
- Tomlinson, D. R., & Gardiner, N. J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrn2294>
- Tsou, R. C., & Bence, K. K. (2012). Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. 6, 192. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00192>
- Unger, R.H., & Orci, L. (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 24(Suppl. 4), S28–S32.
- Vazquez, E. J., Berthiaume, J. M., Kamath, V., Achike, O., Buchanan, E., Montano, M. M., Rosca, M. G. (2015). Mitochondrial complex i defect and increased fatty acid oxidation enhance protein lysine acetylation in the diabetic heart. *Cardiovascular Research*, 107(4), 453–465. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv183>
- Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *Journal of Clinical Investigation*. 6(9), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060237>
- Watt, M. J., Steinberg, G. R., Chen, Z. P., Kemp, B. E., & Febbraio, M. A. (2006). Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *The Journal of physiology*, 574(Pt 1), 139-47.
- Williams, G. & Fruhbeck G. (2009). *Obesity: science to practice*. Briston Inglaterra. Editorial Wiley-Blackwell. 111-237. ISBN: 978-0-470-01911-5
- Wu, H.-W., Ren, L.-F., Zhou, X., & Han, D.-W. (2014). A high-fructose diet induces hippocampal insulin resistance and exacerbates memory deficits in male

Sprague-Dawley rats. *Nutritional Neuroscience*, 18(7), 1–6.
<https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000133>

Yeo, G. S. H., Lam, B. Y. H., Cimino, I., Pox-Wolf, J., Nicole Kohnke, S., Rimmington, D. & Coll, A. P. (2017). Heterogeneity of hypothalamic Pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Molecular Metabolism*, 6(5), 383–392.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.02.007>

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., & Cai, D. (2008). Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 135(1), 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.043>

Zhao, W., Feng, H., Sun, W., Liu, K., Lu, J. J., & Chen, X. (2017). Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox Biology*, 11, 524–534.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.036>