

Sofía Estrada Nieves

"APROXIMACIÓN METABOLÓMICA PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSICIÓN
OBESIDAD RESISTENCIA A LA INSULINA EN UN MODELO DE *DROSOPHILA*
MELANOGASTER"

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

"Aproximación metabólica para el estudio
de la transición obesidad- resistencia a la
insulina en un modelo de *Drosophila*
melanogaster"

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
Grado de

Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Sofía Estrada Nieves

Dirigido por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Co-Director:

Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado

Querétaro, Qro. a 15 de junio 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Aproximación metabólica para el estudio de la transición obesidad-resistencia a la insulina en un modelo de *Drosophila melanogaster*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en
Química Clínica Diagnóstica

Presenta
Licenciada en Microbiología Sofía Estrada Nieves

Dirigido por:

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Co-dirigido por:
Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez

Presidente

Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado
Secretario

M. en C. David Gustavo García Gutiérrez
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio 2022
México

DEDICATORIA

A mis padres Claudia Nieves y José Antonio Estrada quienes con su ejemplo de sabiduría y paciencia fomentaron en mí el amor por la ciencia, forjando el carácter que me permitió construir una vida dedicada a la academia.

A mis hermanos y amigos de quienes siempre he recibido un apoyo incondicional y un impulso entusiasta para cumplir mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), mi máxima casa de estudios desde mi educación media superior, Licenciatura en Microbiología y posgrado en Química clínica Diagnóstica, agradezco haber formado parte de una de las más prestigiadas universidades a nivel nacional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para alcanzar es logro académico.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2020 y al FONDO “QUÍMICA SOMOS TODOS” 2020 por el financiamiento económico que fungió como parte indispensable para el desarrollo práctico del proyecto.

Al laboratorio de Bioquímica Molecular, de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro y al laboratorio de Genética de Transducción de Señales Instituto de Neurobiología, UNAM, por haber prestado sus instalaciones para concertación de este proyecto.

A la M. en C. Brenda Ugalde por haber prestado de su tiempo para instruirme guiarme y asesorarme de la manera más atenta a la realización técnica de este proyecto.

A la Dra. Rosalía Reynosa, a la M. en C. Alma Delia Bertadillo y al M. en C. David Gustavo quienes brindaron su asesoría y fueron un apoyo indispensable en esta investigación.

Por último, a mi directora de tesis, la Dra. Iza Fernanda Pérez y al Dr. Juan Manuel Murillo, codirector de este proyecto, ambos por brindarme su confianza y apoyo para cumplimiento de este proyecto, por compartir sus enseñanzas, por ser mi guía impulsarme y ser motivo de inspiración para dedicar mi vida a la ciencia.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

índice

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:	5
Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
Abreviaturas y siglas	11
Resumen	13
Abstract	14
1 Introducción	15
2 Antecedentes	18
2.1.1 Obesidad	18
2.1.2 Alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad: Resistencia a la insulina	18
2.1.3 Diabetes mellitus (DM)	19
2.1.4 Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2	20
2.1.5 Factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2	21
2.1.6 Aspectos clínicos de la diabetes mellitus tipo 2	22
2.1.7 Métodos de diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2	23
2.2 Insulina	24
2.2.1 Regulación metabólica de la insulina	24
2.2.2 Señalización de la insulina	25
2.3 Resistencia a la insulina	26
2.3.1 El papel del tejido adiposo en la resistencia a la insulina	27
2.3.2 Inflamación y resistencia a la insulina	27
2.3.3 Estrés oxidativo en la resistencia a la insulina	28
2.3.4 Disfunción de las células beta pancreáticas	28
2.4 Metabolómica	29
2.4.1 Metabolómica como herramienta para la búsqueda de biomarcadores de enfermedades metabólicas	30
2.4.2 Redes metabólicas y análisis de datos	31
2.5 Modelos para el estudio de enfermedades crónico-degenerativas	32
2.5.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de obesidad	32

2.5.2	<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de diabetes	34
2.5.3	Ventajas de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	36
3	Hipótesis	38
4	Objetivos	39
4.1	General.....	39
4.2	Particulares.....	39
5	Metodología	40
5.1	Diseño	40
5.1.1	Definición del universo	40
5.1.2	Tamaño de la muestra	40
5.1.3	Criterios de inclusión	41
5.1.4	Criterios de exclusión	41
5.1.5	Definición de unidades de medidas	41
5.2	Inducción de obesidad en mosca macho adultos.....	41
5.2.1	Cepa de <i>Drosophila melanogaster</i>	41
5.2.2	Dieta estándar	42
5.2.3	Dieta alta en grasas (HFD)	42
5.2.4	Dieta alta en azúcares (HSD)	43
5.3	Variables bioquímicas	43
5.3.1	Evaluación de la supervivencia	43
5.3.2	Medición del peso corporal de las moscas	43
5.3.3	Determinación de triglicéridos totales	44
5.3.4	Determinación de glucosa+trehalosa en hemolinfa	44
5.4	Determinación de la expresión de <i>Dilp2</i>	45
5.4.1	Extracción de RNA.....	45
5.4.2	Retrotranscripción.....	46
5.4.3	Análisis cuantitativo mediante RT- PCRq.....	47
5.5	Análisis lipidómico	48
5.5.1.	Preparación de la muestra	48
5.5.2	Análisis por UPLC-ESI-QToF MSE	49
5.6	Análisis de datos.....	50
5.6.1	Análisis de perfil metabolómico	50

5.6.2 Análisis estadístico	50
6. Resultados	52
6.1 Viabilidad de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares	52
6.2 Peso corporal de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares	53
6.3 Triglicéridos totales de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares	54
6.4 Concentración de glucosa+trehalosa en hemolinfa de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares	56
6.4 Expresión de <i>Dilp2</i> en cabezas de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares.....	57
6.5 Análisis lipidómico de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares	58
7.1 Efecto de una dieta alta en grasa sobre la inducción de obesidad en <i>D. melanogaster</i>	68
7.2 Efecto de una dieta alta en azúcares sobre la inducción de obesidad en <i>D. melanogaster</i>	69
7.3 Efecto de una dieta alta en azucares sobre la inducción de resistencia a la insulina en <i>D. melanogaster</i>	71
7.4 Efecto de una dieta alta en azucares sobre la inducción de DM2 en <i>D. melanogaster</i>	73
8 Conclusión	78
9 Referencias	79
10 Anexo 1	86

Índice de tablas

Tabla 1 Unidad de medidas bioquímicas	41
Tabla 2 Ingredientes para la preparación de alimento estándar de <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Tabla 3 Oligos para el análisis por PCRq	47
Tabla 4 Ciclos de amplificación para RT- PCRq	48
¡Error! Marcador no definido.49	
Tabla 6 Perfil lipidómico de D melanogaster alimentado con una dieta en azúcares por 14 días	67

Índice de figuras

Figura 1 Prevalencia estimada de DM2 a nivel mundial para el año 2040	21
Figura 2 Vía de señalización de la insulina	26
Figura 3 Analisis de supervivencia	52
Figura 4 Peso total en mg de moscas HFD versus el grupo SD	53
Figura 5 Peso total en mg de moscas HSD versus el grupo SD	54
Figura 6 Triglicéridos totales de moscas HFD versus el grupo SD	55
Figura 7 Triglicéridos totales de moscas HSD versus el grupo SD	56
Figura 8 Glucosa + trehalosa en hemolinfa de moscas tratadas con HSD y STD.	57
Figura 9 Expresión relativa de <i>Dilp2</i> en moscas alimentadas con SD y HSD	58
Figura 10 Modelos de Análisis de Componentes Principales (A) y Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales	60
Figura 11 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 2 de tratamiento HSD	62
Figura 12 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 4 de tratamiento HSD	63
Figura 13 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 6 de tratamiento HSD	63
Figura 14 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 8 de tratamiento HSD	64
Figura 15 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 10 de tratamiento HSD	64
Figura 16 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 12 de tratamiento HSD	65
Figura 17 Modelo PLS-DA y proyección VIP al día 14 de tratamiento HSD	65
Figura 18 Efecto de la dieta HSD en el perfil lipídico	66

Abreviaturas y siglas	
Diabetes mellitus tipo 2	DM2
Dieta rica en azúcares	HSD
Organización Mundial de la Salud	OMS
Ácidos grasos libres	AGL
Diabetes mellitus	DM
Asociación Americana de Diabetes	ADA
Diabetes mellitus tipo 1	DM1
Diabetes mellitus gestacional	DMG
Diabetes monogénica	MODY
Federación Internacional de Diabetes	IDF
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Glucosa plasmática en ayunas	FPG
Hemoglobina glicosilada A1c	Hb1Ac
Programa Nacional de Estandarización de la Glicohemoglobina	NGSP
Transportador de glucosa 2	GLUT2
Fosfatidil inositol 4,5- bifosfato	PIP2
Sustrato receptor de insulina	IRS
Diacilglicerol	DAG
Ácido fosfórico	PA
Especies reactivas de hidrogeno	ROS
Proteína C reactiva	PCR
Receptores tipo toll 4	TLR4
Respuesta de desdoblamiento de proteínas	UPR
Polipéptido inhibidor gástrico	PIG
Péptido similar al glucagón tipo 1	GLP-1
Lisofosfatidilcolinas	lysoPC

Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales	PLS-DA
Análisis de componentes principales	PCA
Triglicéridos	TAG
Dieta rica en grasas	HFD
Oregon R	ORR
Dieta estándar	SD
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	PCRq
Espectrómetro de masas cuadrupolo/tiempo de vuelo con una fuente de ionización por electropulverización a presión atmosférica	UPLC-ESI-QTOF
Células productoras de insulina	IPC
Apolipoproteína D	ApoD

Resumen

La obesidad es una fisiopatología asociada a una serie de alteraciones metabólicas, como resistencia a la insulina y Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Si bien se reconoce la conexión cronológica de estas enfermedades, hasta el momento no se ha logrado caracterizar los mecanismos moleculares que subyacen su transición. *Drosophila melanogaster* ha fungido como modelo de obesidad y resistencia a la insulina, por su alta homología genética con mamíferos. El presente proyecto abordó la caracterización de la transición de obesidad a resistencia a la insulina en un modelo de *D. melanogaster* a través de un enfoque lipidómico y quimiométrico para identificar biomarcadores candidatos de diagnóstico preventivo de la DM2. Se desarrolló un modelo de obesidad crónica en la mosca inducido por un tratamiento a dieta rica en azúcares (HSD) durante 14 días, expresado como el incremento total de triglicéridos en la mosca completa, acompañado de un fenotipo de hiperglucemia crónica en hemolinfa de la mosca. La resistencia a la insulina fue evaluada mediante la determinación de la expresión del péptido similar a la insulina 2 (*Dilp2*), se observó un incremento de la expresión en las etapas tempranas de inducción y una disminución en tiempo prolongados, interpretado como un efecto compensatorio de la hiperglucemia desencadenante. El análisis lipidómico (UPLC-QTOF MS^E) reveló resultados comparables con la cronología del modelo experimental. Se identificaron 6 tipos de metabolitos con un efecto en la abundancia tras el tratamiento HSD. Los FA 16:0, FA 16:1 y FA 18:1 mostraron un incremento significativo en el día 4 y 6, mientras que LysoPE 16:1 y LysoPE 18:1 mostraron una disminución en el día 2 y un aumento al día 4 y 6, por su parte PE 16:0/16:1 se mantuvo incrementado desde el día 2 al 6. Estos resultados señalan la importancia en la temporalidad del día 2 y 4 como puntos clave en el progreso de obesidad a resistencia a la insulina, sugiriendo una posible participación de los metabolitos cambiantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

Palabras clave: *Drosophila melanogaster*; obesidad; diabetes mellitus; resistencia a la insulina; lipidoma.

Abstract

Obesity is a pathophysiology associated with a series of metabolic alterations, such as insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (DM2). Although the chronological connection of these diseases is recognized, to date it has not been possible to characterize the molecular mechanisms underlying their transition. *Drosophila melanogaster* has served as a model of obesity and insulin resistance, due to its high genetic homology with mammals. This project addressed the characterization of the transition from obesity to insulin resistance in a *D. melanogaster* model through a lipidomic and chemometric approach to identify candidate biomarkers for preventive diagnosis of DM2. A successful model of obesity was developed in the fly induced by a high-sugar diet (HSD) for 14 days, expressed as the total increase of triglycerides in the complete fly, accompanied by a phenotype of chronic hyperglycemia in fly hemolymph. Insulin resistance was evaluated by the expression of *Drosophila* insulin-like peptide 2 (*Dilp2*), we observed an increase in the early stages of HSD induction and a long-term decline interpreted as a compensatory effect of the triggering hyperglycemia. The lipidomic analysis (UPLC-QTOF MSE) reveals results comparable with the chronology of the experimental model. 6 types of metabolites were identified with an effect on abundance after HSD treatment. FA 16:0, FA 16:1, and FA 18:1 were significantly increased on 4 and 6 days, while LysoPE 16:1 and LysoPE 18:1 were decreased on 2 days and increased on days 2, 4, and 6, while PE 16:0/16:1 steadily increased from day 2 to 6. These results indicate the importance HSD induction on days 2 and 4 in the transition of obesity to resistance to insulin, suggesting their possible role of changing metabolites in the development of insulin resistance.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, obesity; diabetes mellitus; insulin resistance; lipidome.

1 Introducción

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por una acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo, es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como emergencia epidemiológica y representa uno de los principales problemas en el tema de salud pública debido a su alta prevalencia. El sobrepeso y la obesidad afecta a más del 70% de la población mexicana (ENSANUT Medio Camino, 2018) y promueve el desarrollo de una serie de alteraciones metabólicas, entre las que destaca la resistencia a la insulina, lo que en conjunto conlleva a una alta vulnerabilidad para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Ortega *et al.*, 2019).

La resistencia a la insulina es un trastorno reconocido particularmente durante la obesidad y la DM2, caracterizada por una deficiencia progresiva en la secreción, señalización y acción de la insulina, hormona que regula el metabolismo de lípidos, carbohidratos, grasas y proteínas. Esta afección altera la interacción entre la insulina y su receptor, afectando todos los procesos desencadenantes e inhibiendo su cascada de señalización, lo que finalmente se ve reflejado en un aumento en los niveles de glucosa en sangre (Reaven, 2005).

La DM2 es una fisiopatología sistémica crónico degenerativa que conduce a una serie de trastornos metabólicos como retinopatías, neuropatía y nefropatías, alteraciones asociadas a un estado de resistencia a la insulina y una hiperglucemia degenerativa (American Diabetes Association, 2019). La DM2 es una enfermedad reconocida por la OMS como una epidemia de amenaza mundial, que representa una alta tasa de mortalidad a nivel mundial. En el 2020, la diabetes mellitus fue posicionada como la tercera causa de defunciones en México, según encuestas nacionales y el reporte de INEGI 2021, cuya tasa de mortalidad tiene una tendencia ascendente donde 151 019 personas fallecieron como consecuencia de la diabetes mellitus, representando el 14% del total de defunciones (1 086 743) en el país (ENSANUT Medio Camino, 2018).

A pesar de que se conoce la fuerte asociación que existe entre obesidad, el desarrollo de resistencia a la insulina y DM2, las causas moleculares subyacentes

no son del todo conocidas. Por lo tanto, definir esta relación proporcionará información importante en el mecanismo de patogenicidad de la DM2, así como la identificación de biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano y la búsqueda de dianas terapéuticas.

El diagnóstico temprano de la DM2 es crucial para el desarrollo de estrategias de control y prevención de factores de riesgo que incrementan las probabilidades de desarrollar DM2, por lo tanto, representa un enfoque con mayor costo-beneficio. Sin embargo, dicho diagnóstico suele ser deficiente ya que la hiperglucemia se desarrolla de forma gradual y no logra ser detectada en etapas tempranas, siendo que los biomarcadores actuales como hemoglobina glicosilada A1c (Hb1Ac) exhiben ciertas limitaciones predictivas. Es por ello que se requiere la identificación de nuevos biomarcadores que muestren una mejor sensibilidad y especificidad para predecir el desarrollo de esta enfermedad (American Diabetes Association, 2019).

La metabolómica es una ciencia ómica que permite analizar el perfil de metabolitos, tanto polares como no polares, de bajo peso molecular (<1200 Da) en una muestra biológica, los cuales pueden ser intermediarios o productos de las reacciones bioquímicas del organismo, por lo que permite analizar los cambios bioquímicos a nivel celular y sus fenotipos clínicos. Es por ello que se considera una herramienta óptima para categorizar las diferentes etapas previas y posteriores al desarrollo de resistencia a la insulina y DM2 y la búsqueda de un potencial biomarcador de predicción para el desarrollo de la enfermedad (Li *et al.*, 2019).

Para la caracterización de la transición de obesidad a resistencia a la insulina, es necesario llevar a cabo estudios longitudinales en poblaciones grandes de casos incidentes con resistencia a la insulina y realizar un monitoreo constante de los cambios metabólicos, estudios que implican un gran compromiso en tiempo y dinero. Por esta razón, *D. melanogaster*, conocida como mosca de la fruta, representa un modelo ideal para el estudio de obesidad y sus alteraciones metabólicas, debido a que la mosca comprende una alta homología genética con el mamífero, presentando todo un sistema fisiológico que va desde genes, órganos y tejidos, involucrados en la obesidad y enfermedades metabólicas, conserva de

forma evolutiva la vía de señalización de la insulina, presenta proteínas homólogas que regulan su crecimiento y metabolismo, además presenta alteraciones patológicas semejantes a las características de la DM2, como retinopatía y neuropatía (Musselman & Kühnlein, 2018; Murillo Maldonado *et al.*, 2011). Es por ello, que dicho modelo permitiría el estudio de la transición de la obesidad a la resistencia a la insulina, como un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de DM2, con un enfoque longitudinal.

Por todo lo anterior, el objetivo de este proyecto fue emplear el modelo de *D. melanogaster* para dilucidar la transición obesidad-resistencia a la insulina e identificar moléculas que puedan ser propuestas como candidatos a biomarcador de diagnóstico temprano por medio de un enfoque metabólico.

2 Antecedentes

2.1.1 Obesidad

La obesidad es una fisiopatología definida como la acumulación excesiva de grasa adiposa (OMS, 2020), promovida por una dieta desbalanceada rica en grasas, por ejemplo, una elevada ingesta calórica, sobrecarga de carbohidratos y grasas saturadas que influyen en la acumulación excesiva de grasa visceral, produciendo un aumento de índice de masa corporal (IMC), uno de los principales indicadores de dicha enfermedad.

A nivel mundial, se ha observado un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en las últimas cuatro décadas, especialmente en Latinoamérica. Se estima que estas condiciones afectan alrededor del 71.2 % de la población en México entre los 30 y 65 años. Actualmente se reconoce la fuerte asociación con el desarrollo de DM2 y se estima que cerca del 80 a 90% de personas con DM2 son obesas (ENSANUT, 2018).

2.1.2 Alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad: Resistencia a la insulina

En un estado de obesidad, la acumulación de grasa adiposa se refleja en alteraciones metabólicas como dislipidemias que aumentan la acumulación de ácidos grasos libres (AGL), que consecuentemente desencadenan la activación de interleucinas proinflamatorias como IL-1 y TNF α , que inducen una respuesta inflamatoria (Palacios, *et al.*, 2012). Por esta razón es reconocido un estado de inflamación de bajo grado durante la obesidad, que desencadena otro tipo de alteraciones metabólicas como citotoxicidad asociada a la resistencia a la insulina, y que consecuentemente concluyen en una alta vulnerabilidad para el desarrollo de la DM2 (Ortega-Loubon, *et al.*, 2019).

El tejido adiposo no solo efectúa la función de almacén de energía y nutrientes, además es un órgano endocrino e inductor hormonal de citosinas, factores de crecimiento y hormonas que regulan la homeostasis metabólica (Frigolet *et al.*, 2020). En consecuencia, durante la obesidad, el aumento de lípidos en tejido

adiposo contribuye al aumento en los niveles hormonales que consecuentemente conducen al desarrollo de trastornos metabólicos (Vega & Rico 2019).

La resistencia a la insulina es un trastorno que se puede presentar durante la obesidad afectando principalmente los niveles de glucosa en sangre, generando una hiperglucemia crónica y una hiperinsulinemia compensatoria. El mecanismo que conduce estos eventos es, por una parte, impulsado por una disminución de la respuesta metabólica de las células diana a la insulina (músculo, hígado, tejido adiposo) y, por otro lado, provocado por una alteración en la secreción de insulina en las células beta pancreáticas (Ye, 2021).

2.1.3 Diabetes mellitus (DM)

Según la OMS, la DM es una “enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. La hiperglucemia sostenida con el tiempo se asocia a daño, disfunción y falla de varios órganos y sistemas, especialmente riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos” (OMS, 2016).

El término ‘diabetes’ fue descrito por Apollonius de Memphis en el año 250 a.C. y hace referencia a uno de los signos más representativos, la eliminación exagerada de agua en orina, dicho término puede remontarse hasta el origen de la enfermedad, en el siglo XV a.C., conocido por griegos, egipcios, chinos, indios y persas por el dulce sabor a miel de la orina. Posteriormente, Thomas Willis le atribuyó el apellido ‘mellitus’ que en latín significa dulce o enmelado (Lakhtakia, 2013). Actualmente, esta enfermedad es clasificada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) en tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional (DMG) y otros tipos específicos de diabetes ocasionados por diferentes causas (American Diabetes Association, 2019).

La DM1 se caracteriza por la deficiencia total o parcial en la producción de insulina ocasionada por la destrucción de las células beta del páncreas; la DM2 se

caracteriza por la pérdida progresiva de la secreción de insulina de células beta asociada a un estado de resistencia a la insulina; la DMG se caracteriza por presentar un estado anormal de tolerancia a la glucosa durante el embarazo; y otros tipos específicos de diabetes que son provocados por distintas causas, como el síndrome de diabetes monogénica (MODY), enfermedades del páncreas exocrino, fibrosis quística y diabetes inducida por sustancias químicas como el uso de glucocorticoides (American Diabetes Association, 2019).

2.1.4 Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es el tipo de DM que presenta la mayor prevalencia a nivel mundial, con aproximadamente el 90% de los casos.

A nivel mundial, la DM2 representa una amenaza grave de mortalidad y una verdadera emergencia de salud pública.

La Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) en 2019 pronostico que la prevalencia de DM a nivel mundial en los años 2030 y 2045 será de 463 millones de adultos entre los 20 y 79 años (Figura 1), ya que se ha descrito una tendencia creciente en las últimas décadas (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

En México, según datos de la ENSANUT MC (2018), los estados con prevalencia más alta son: Ciudad de México, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí.

La secretaria de Salud del estado de Querétaro dio a conocer el registro de 22 mil 733 pacientes con DM2 y 630 defunciones en el 2018 (SESEQ, 2018). La alta prevalencia de DM se encuentra asociada a la dieta y a la alta prevalencia de

sobrepeso y obesidad, lo que incrementa la probabilidad de desarrollar la enfermedad (Alegre-Díaz *et al.*, 2016).

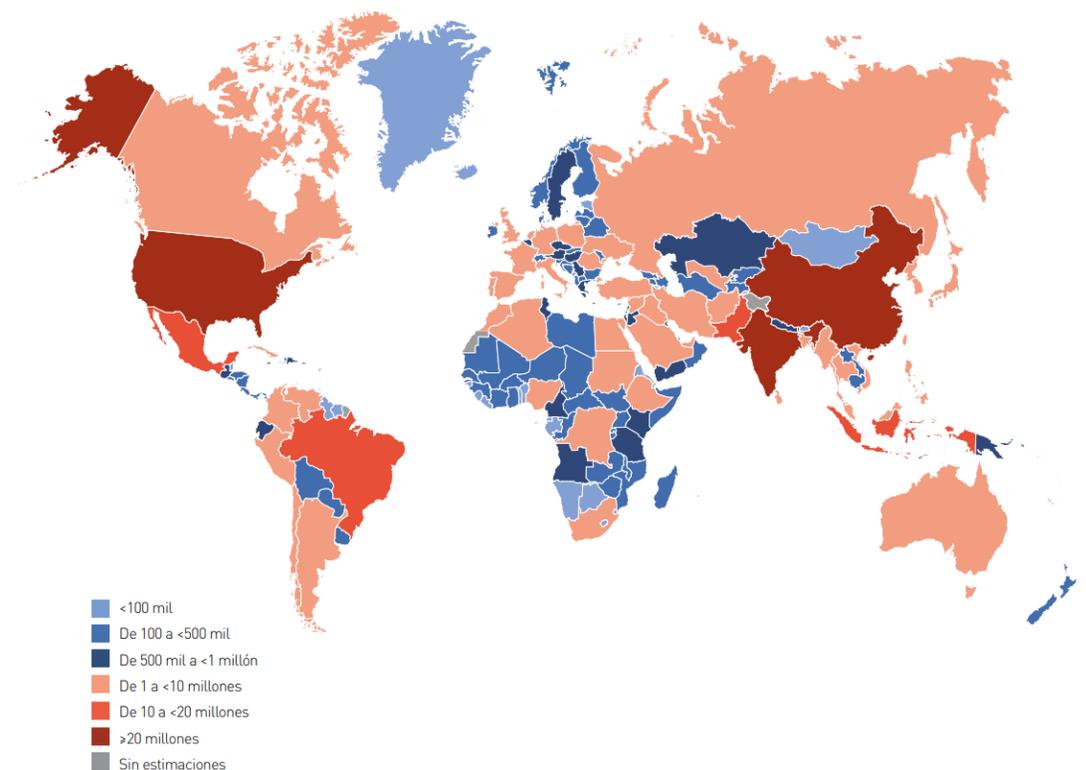


Figura 1. Prevalencia estimada de DM a nivel mundial para el año 2030-2045 (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

2.1.5 Factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2

La probabilidad de desarrollar DM2 depende de una combinación de factores de riesgo que pueden estar asociados a predisposición genética, cuyo factor no puede modificarse como la carga genética o antecedentes familiares. Se sabe que la posibilidad de desarrollar DM2 con un antecedente familiar puede ser hasta del 40%. Actualmente se han identificado más de 20 genes asociados al desarrollo de DM2. Por ejemplo, el gen *PPARG* que codifica a PPAR γ , un receptor nuclear de factores de transcripción dependientes de ligando cuya función es regular la

diferenciación y el metabolismo de adipocitos, se expresa preferentemente en tejido adiposo, está asociada con la resistencia a la insulina y cuando esta alterado conlleva a un riesgo 20% mayor de desarrollar DM2 (Małodobra *et al.*, 2021).

Basados en la prevalencia de la enfermedad, se considera que las mujeres mayores a 25 años tienen mayor predisposición para desarrollar DM2, debido a los cambios hormonales o afecciones como el síndrome de ovarios poliquísticos y alteraciones durante el embarazo como diabetes gestacional, incrementando significativamente la predisposición a desarrollar DM2. La edad es otro factor de riesgo asociado, según los datos referentes al ENSANUT (2018) donde asocia el incremento de la edad con diagnóstico de hipertensión, obesidad y DM2.

Otros factores de riesgo que incrementan la probabilidad para desarrollar DM2 están asociados al estilo de vida como la dieta o alimentación, el sobrepeso y la obesidad, o el sedentarismo y el tabaquismo. Estos factores pueden ser modificables cambiando el estilo de vida, logrando con ello disminuir significativamente las probabilidades de desarrollar la enfermedad (American Diabetes Association, 2019b).

2.1.6 Aspectos clínicos de la diabetes mellitus tipo 2

La hiperglucemia crónica es un padecimiento degenerativo, ocasionado por los elevados niveles de glucosa en sangre, que pueden desembocar en la deficiencia progresiva tanto en la acción y la secreción de insulina, afectando todos los procesos asociados a la señalización de la insulina como síntesis de proteínas, metabolismo de carbohidratos, lípidos y grasas. Estas manifestaciones metabólicas corresponden a un estado de resistencia a la insulina que tiene efectos sobre los tejidos diana de esta hormona como músculo, hígado y tejido adiposo (Czech, 2017a).

En consecuencia, dichas alteraciones pueden conducir a un estado fisiopatológico conocido como DM2, que se caracteriza por alteraciones metabólicas promovidas por el mismo desbalance hiperglucémico.

Las alteraciones metabólicas generan un desbalance en los niveles de glucosa, que, si bien pueden ser silenciosas durante cierto periodo de tiempo, a largo plazo

conducen a una hiperglucemia crónica, que refleja la gravedad del estado metabólico y la situación clínica de una persona (Czech, 2017a). Esto consecuentemente conduce a complicaciones microvasculares relacionadas con la pérdida de función. Las complicaciones microvasculares características de la DM2 son:

- Retinopatía diabética. Referida a la pérdida de visión consecuente de los altos contenidos de glucosa en sangre que comprometen los vasos sanguíneos localizados en la retina, aumentando su permeabilidad, obstruyendo el flujo sanguíneo o produciendo hemorragias generadas por la ruptura de los vasos (Huang, *et al.*, 2019).
- Neuropatía. Es el daño neurológico que ocurre en consecuencia de la hiperglucemia y que afecta los nervios sensibles o motores manifestándose a través de diferentes complicaciones como endurecimiento en las piernas o incluso problemas relacionados con la digestión, vejiga y control del ritmo cardíaco (Ko & Cha, 2012).
- Nefropatía. Se manifiesta en la disminución progresiva de filtración glomerular, que puede conducir a insuficiencia renal (Huang *et al.*, 2019)

2.1.7 Métodos de diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2

Durante años, el método de diagnóstico de la DM2 ha estado basado en la medición de los niveles de glucosa en plasma en ayuno (FPG). Este criterio fue definido en 1997 por el primer Comité de Expertos en Diagnóstico y Clasificación de la DM, quienes realizaron estudios epidemiológicos donde medían la glucemia como FPG y evaluaban la retinopatía. A partir de estos estudios se demostraron los niveles glucémicos en los que la prevalencia de retinopatía aumentaba de forma lineal, es así como establecieron valores de referencia para el diagnóstico (Boyd & Bruns, 2001).

Se establece un valor para el diagnóstico de la DM2 cuando la glucosa plasmática casual >200 mg/dL; glucosa plasmática en ayuno >126 mg/dL; o bien glucosa

plasmática >200 mg/dL tras dos horas de haber consumido una carga oral de 75 g de glucosa disuelta en agua (ADA, 2019).

La hemoglobina glicosilada A1c (Hb1Ac) en el 2008 fue reconocida por el Comité de Expertos Internacionales como marcador para diagnóstico de DM con umbral de $\geq 6.5\%$ (International Expert Committee, 2009) evalúa el promedio de glucosa en sangre de los últimos tres meses. Esta prueba tiene limitaciones en su diagnóstico, debido a la variabilidad en los niveles de Hb1Ac, suelen presentarse niveles bajos a pesar de la DM franca, estimando datos no representativos para el diagnóstico eficiente (International Expert Committee, 2009).

2.2 Insulina

2.2.1 Regulación metabólica de la insulina

La biosíntesis de la glucosa es regulada en hígado mediante diferentes procesos metabólicos como la gluconeogénesis, durante la cual se sintetiza glucosa a partir de componentes no glúcidos como glicerol, aminoácidos, lactato y piruvato, y la glucogenólisis proceso catabólico que degrada glucógeno en glucosa. Estos procesos permiten mantener un equilibrio en la homeostasis de glucosa y son regulados por la insulina (Czech, 2017b).

La insulina es secretada por las células beta del páncreas de los islotes de Langerhans, cuya expresión y secreción es dependiente de la concentración de glucosa en la sangre. Su principal acción radica en el metabolismo de la glucosa, estimulando su almacenamiento y absorción en músculo y tejido adiposo e inhibiendo su producción hepática (Vázquez-Jiménez, *et al.*, 2017).

Tras el aumento de glucosa en sangre, ésta se introduce a las células beta a través del transportador de glucosa 2 (GLUT2). Dentro de la célula, la glucosa es metabolizada por la vía de glucólisis, donde se oxida para la producción de energía en forma de ATP, esto ocasiona que se cierren los canales de potasio (K^+) dependientes de ATP y estimula la despolarización de la membrana celular, impulsando la activación de los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje y la consecuente entrada de Ca^{2+} extracelular. Lo anterior induce la activación de la

fosfolipasa C, enzima que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5- bifosfato (PIP2) en inositol 1,4,5 – trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), IP3 viaja a la membrana del retículo endoplasmático (RE) y activa los canales de Ca^{2+} induciendo su liberación y aumentando su concentración citoplasmática, esto provoca la activación de sinaptotagmina que libera los gránulos de insulina previamente sintetizada y almacenadas en vesículas secretoras. De esta forma, la insulina es liberada y viaja por el sistema endocrino hasta las células dianas donde tiene diferentes efectos metabólicos (Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017).

2.2.2 Señalización de la insulina

En el hígado, músculo y tejido adiposo se inicia la señalización de la insulina tras la activación de receptores de insulina (IR) de membrana con actividad de tirosina quinasa. Tras ser activados, estos receptores se autofosforilan y reclutan a dos proteínas adaptadoras, el sustrato del receptor de insulina (IRS) y la proteína transformadora 1 (SHC1), estas proteínas son fosforiladas y desencadenan diferentes cascadas de señalización. SHC activa la vía de las MAP quinasas desencadenando acciones mitogénicas como el crecimiento y la diferenciación celular, mientras que IRS recluta a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que fosforila a PIP2 produciendo PIP3, permitiendo el reclutamiento de la proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK) a la membrana y la consecuente activación de la proteína quinasa B (PKB o AKT) (Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017) (Figura 2).

AKT regula la activación de diversos eventos metabólicos a partir de la inducción de diferentes cascadas de señalización, favorece la síntesis de glucógeno por la fosforilación de la quinasa de glucógeno sintasa 3 (GSK-3), estimula la síntesis de proteínas por activación de la vía mTor, inhibe la gluconeogénesis fosforilando y manteniendo al factor de transcripción FOXO1 en el citoplasma, suprime la lipólisis en adipocitos y uno de sus actividades principales es traslocar al transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana de adipocitos y células musculares,

incrementando la captación de glucosa de la sangre (Vázquez-Jimenez *et al.*, 2017).

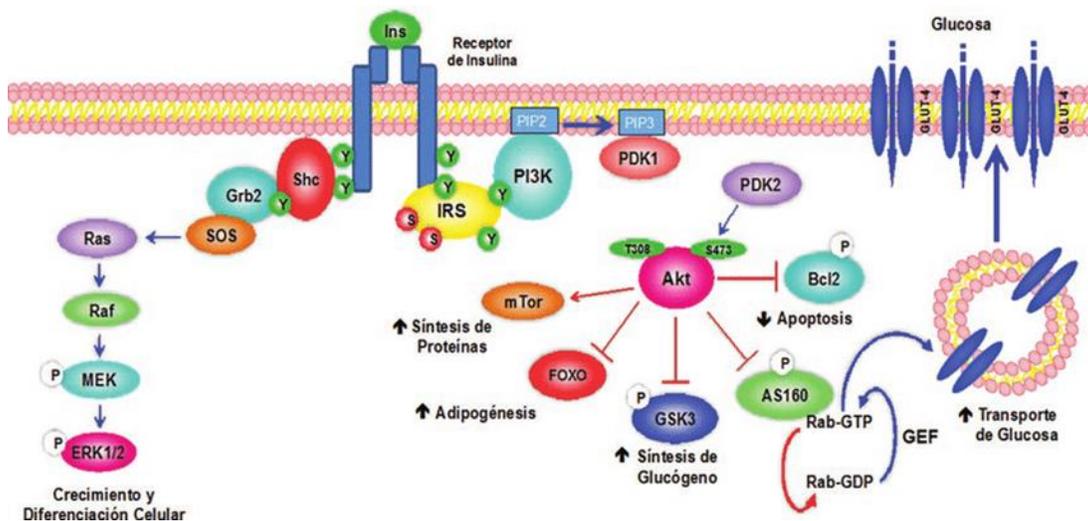


Figura 2. Vía de señalización de la insulina (Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017) AKT: proteína cinasa B; AS160: sustrato de AKT de 160 kDa; GLUT-4: transportador de glucosa 4; GSK3: proteína quinasa de glucógeno sintasa 3; IRS: sustrato del receptor de insulina; PDK1: proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos 1; PDK2: proteína cinasa dependiente de fosfoinositidos 2; PI3K: cinasa de fosfatidilinositol 3; PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato.

2.3 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una afección patológica compleja consecuencia de la respuesta celular inapropiada de la hormona insulina frente a sus células diana insulino dependientes, promoviendo una serie de alteraciones metabólicas debido a su implicación en diversos procesos incluidos la glucólisis, glucogenólisis, gluconeogénesis, lipogénesis, síntesis proteica, etc. Las causas moleculares no son del todo conocidas. Se conoce la implicación de un estado de obesidad crónica en donde el tejido adiposo muestra alteraciones como hipertrofia adipocitaria generando lipotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación. Estas alteraciones desencadenan una deficiente interacción entre la insulina y su receptor, generando fosforilaciones inhibitorias a nivel del sustrato del receptor de insulina (IRS) lo que concluye en una disfunción en todos los procesos desencadenantes, inhibiendo las

cascadas de señalización, afectando la translocación de GLUT4 y disminuyendo la captación de glucosa (Yaribeygi *et al.*, 2019).

2.3.1 El papel del tejido adiposo en la resistencia a la insulina

El tejido adiposo, la principal reserva energética del organismo, tiene la capacidad de almacenar energía en forma de grasa, pero también es un órgano con función endocrina que secreta diversas hormonas llamadas adipocinas que juegan un papel importante en la regulación metabólica y que han sido implicadas en la resistencia a la insulina. La obesidad visceral puede generar alteraciones a nivel del tejido adiposo promoviendo hipertrofias adipocitarias, que concluyen en trastornos metabólicos como resistencia a la insulina (Simone *et al.*, 2020).

El trastorno hipertrófico en adipocitos estimula la liberación de citocinas proinflamatorias y el incremento en receptores adrenérgicos que consecuentemente promueven la lipólisis en adipocitos (Simone *et al.*, 2020). Dicho proceso catabólico genera la acumulación de AGL y especies reactivas de hidrogeno (ROS) en el tejido adiposo (Czech, 2017a). Esto implica la formación de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos como Diacilglicerol (DAG), ácido fosfórico (PA) y ceramidas (Samuel & Shulman, 2016).

Estos eventos se traducen en lipotoxicidad a nivel del tejido adiposo que progresivamente promueve en hígado y musculo esquelético estrés oxidativo, inflamación y apoptosis, procesos celulares asociados a la resistencia a la insulina (Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017; Titchenell *et al.*, 2016).

Por otra parte, la liberación de AGL promovida por la lipólisis en adipocitos impulsa la gluconeogénesis hepática, por medio de la síntesis acrecentada de ceramidas, que estimula una activación alterada de Akt y restringe la inactivación de FOXO1 que finalmente contribuyen en el aumento de la glucosa hepática (Czech, 2017a).

2.3.2 Inflamación y resistencia a la insulina

La hipertrofia en el tejido adiposo genera una alteración en sus funciones metabólicas y endócrinas que desencadena en la activación de procesos inflamatorios, esto produce el incremento en la producción de macrófagos que promueven la expresión de citosinas proinflamatorias como TNF-alfa, IL1 e IL6,

resistina y otras proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria como la proteína C reactiva (PCR) moléculas involucradas en el deterioro metabólico de la insulina y el desarrollo de DM2 (Simone *et al.*, 2020; Aleman & Guerrero, 2018).

El proceso inflamatorio se desencadena como respuesta a la acumulación de AGL y ROS que se disparan en la obesidad, estimulando la activación de receptores tipo toll 4 (TLR4) involucrados en el deterioro de la sensibilidad de insulina y su señalización (Benomar & Taouis, 2019). La activación de proteínas de respuesta a estrés como PKC (proteín quinasa C) y JNK promovidas por TLR4, impulsan la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos de serina 307, alterando toda la cascada río debajo de Akt incluyendo la traslocación de GLUT4 que concluye en resistencia a la insulina (Yaribeygi *et al.*, 2019).

2.3.3 Estrés oxidativo en la resistencia a la insulina

El estrés oxidativo en la resistencia a la insulina se genera a causa del incremento en las concentraciones de AGL que promueven la activación de la β -oxidación, y como consecuencia aumenta la demanda energética y la actividad de NADPH y ATP, a su vez esto genera la acumulación de ROS provocando daño a nivel mitocondrial y en el retículo endoplasmático (Gutiérrez, *et al.*, 2017)

El estrés en el retículo endoplasmático es compensado por un mecanismo definido como UPR (unfolding protein response) promoviendo la activación de citocinas como PERK, IRE1 y ATF6. Específicamente PERK y ATF6 promueven la activación de cinasas como JNK y PKC que disminuyen la fosforilación del IRS promoviendo la resistencia a la insulina y alterando la vía PI3K/Akt y MAP cinasas (Gutiérrez *et al.*, 2017).

2.3.4 Disfunción de las células beta pancreáticas

La secreción de la insulina se ve alterada en pacientes con obesidad y DM2, esta alteración se encuentra asociada a una disfunción de las células beta pancreáticas cuya función va deteriorándose progresivamente tras el incremento de los niveles de glucosa en sangre. En pacientes con DM2 se ha observado una disminución en el número de células beta del 20 al 40%, cuya secreción de insulina se ve afectada hasta en un 30%. Hasta el momento no se ha identificado la relación causal de

esta afección; sin embargo, se ha relacionado con la hiperglucemia crónica, los altos niveles de AGL, el desarrollo de estrés oxidativo y la presencia de citosinas proinflamatorias, lo que tiene un efecto negativo sobre la funcionalidad de las células beta pancreáticas contribuyendo a su deterioro (Taylor *et al.*, 2019).

Por otra parte, la disfunción de las células beta se ha asociado a una reducción en la secreción del polipéptido inhibidor gástrico (PIG) y al péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). PIG y GLP-1 son péptidos insulínotropo dependientes de la glucosa, que inducen la secreción de insulina, estimulada por la hiperosmolaridad de glucosa en el duodeno (Taylor *et al.*, 2019).

2.4 Metabolómica

La metabolómica es un nuevo campo emergente de investigación de las ciencias ómicas. La metabolómica es la ciencia que se encarga del estudio del conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico tales como sangre, orina, saliva o tejidos. Esta ciencia ómica estudia el metaboloma completo, es decir el perfil de metabolitos (pequeñas moléculas intermediarias <1500 Da) presentes en una célula, tejido, órgano u organismo producto de sus procesos celulares (Johnson *et al.*, 2016).

A finales de la década de los 40, Roger Williams introdujo el primer concepto de perfil metabolómico presentes en fluidos biológicos que permitían determinar patrones metabólicos asociados a enfermedades a partir del uso de cromatografía de papel (Gates & Sweeley, 1978).

Actualmente se ha logrado completar el primer estudio del metaboloma humano dirigido por el Dr. David Wishart en el año 2007, quien identificó aproximadamente 2500 metabolitos (Wishart *et al.*, 2007). La metabolómica es una herramienta que combina dos técnicas, una de separación como la cromatografía líquida y una herramienta de identificación como la espectrometría de masas, con la finalidad de identificar y cuantificar metabolitos presentes en una muestra con alta sensibilidad y especificidad (Mamas *et al.*, 2011).

Existen dos tipos de análisis metabolómicos: no dirigida y dirigida. La metabolómica no dirigida permite identificar cambios en el perfil metabolómico tras la respuesta a

manipulaciones del sistema biológico, lo que permite comparar dos condiciones biológicas. Por el contrario, la metabolómica dirigida es una herramienta cuantitativa que permite determinar la cantidad de metabolito presente en la muestra. La aplicación de ambas permite analizar desde una perspectiva más amplia la función metabólica (Newgard, 2017).

2.4.1 Metabolómica como herramienta para la búsqueda de biomarcadores de enfermedades metabólicas

La actividad bioquímica de una célula puede ser registrada por el perfil de metabolitos que estén presentes bajo ciertas condiciones, estos metabolitos cambian en respuesta a manipulaciones del sistema biológico. El metaboloma permite definir el fenotipo químico de un ser vivo, que representa el producto de los procesos celulares y revela alteraciones en el mecanismo patológico de una enfermedad, por esta razón permite predecir y evaluar la progresión de una afección e identificar nuevos biomarcadores para el diagnóstico (Rinschen *et al.*, 2019)

Actualmente, la metabolómica representa una herramienta novedosa con un potencial uso para la identificación de biomarcadores de enfermedades metabólicas tales como la obesidad y la DM2 (Arneth *et al.*, 2019). Estas enfermedades representan fisiopatologías con carácter de alteración metabólica tales como hiperlipidemia, hiperglucemia o dislipemias características de síndrome metabólico, y se ha sugerido que el uso de la metabolómica permitirá la comprensión de estas enfermedades y los mecanismos de patogenicidad que la subyacen, demostrando ser una herramienta prometedora para el diagnóstico de trastornos metabólicos. Se ha evaluado las diferencias en el perfil metabolómico de hombres con sobrepeso y con peso normal, e identificaron algunos lisofosfatidilcolinas (lysoPC) como posibles biomarcadores plasmáticos para hombres con sobrepeso y obesidad (Rangel *et al.*, 2019).

También encontraron algunos metabolitos más elevados durante la obesidad como lípidos séricos, lípidos insaturados, glucoproteína, piruvato, treonina y creatinina, a diferencia de urea y glucosa sérica que se encontraban más bajos en pacientes con

obesidad (Rangel *et al.*, 2019). Otros estudios han identificado algunos metabolitos implicados en la obesidad y resistencia a la insulina, tales como aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos como Leu, Ile, Val, Phe y Tyr, que se han asociado con un riesgo cinco veces mayor de desarrollar DM2, demostrando su característica como predictores del desarrollo de DM2 (Arneth *et al.*, 2019). Sin embargo, no son lo suficientemente específicos para la DM2 debido a que se han visto implicados en enfermedades coronarias (Cirulli *et al.*, 2019) (Arneth *et al.*, 2019).

2.4.2 Redes metabólicas y análisis de datos

Los sistemas biológicos y las vías metabólicas de un organismo pueden ser analizados por medio de reconstrucciones formando redes metabólicas, esto permite generar una plataforma matemática correlacionando el metaboloma con la fisiología molecular para la comprensión de los mecanismos moleculares de un organismo. Para la construcción de dichas redes se reúne toda la información metabólica relevante del organismo, lo que puede ser obtenido por medio de un análisis metabolómico no dirigido (Granata *et al.*, 2021).

Por otro lado, el análisis metabolómico no dirigido es comúnmente combinado con un estudio quimiométrico, es decir, análisis multivariado, para identificar metabolitos candidatos a biomarcador. Dichos métodos se realizan comúnmente por medio del estudio supervisado de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el estudio no supervisado de análisis de componentes principales (PCA), los cuáles primeramente indican si existe una discriminación entre los grupos de estudio, que usualmente consisten en casos y controles para estudios de diagnóstico y que pueden incluir grupos con distintos estadios de la enfermedad para estudios de progresión.

Posteriormente, se obtienen los metabolitos discriminantes, es decir, aquellas moléculas que permiten diferenciar entre cada grupo de estudio, los cuales son considerados como biomarcadores de diagnóstico o de progresión. Adicionalmente, el PCA nos permite analizar la dispersión de los datos (Granata *et al.*, 2021). Este análisis permite identificar metabolitos discriminantes en cada etapa de la enfermedad, que podrían funcionar como candidatos a biomarcadores para

predecir el desarrollo temprano de una enfermedad, así como arrojar datos importantes sobre su mecanismo de patogenicidad.

2.5 Modelos para el estudio de enfermedades crónico-degenerativas

La evolución es un proceso de cambio en la estructura genética de una población, alentado por la selección natural, deriva genética, mutaciones y plasticidad fenotípica, que conducen a la adaptación de un organismo frente a su ambiente. Debido a la segregación genética, ciertos genes que son indispensables para la vida se han conservado de forma evolutiva entre organismos de diferentes especies, manteniendo cierta homología genética (Musselman & Kühnlein, 2018).

Gracias a esto, es posible comparar poblaciones humanas con organismos de diferentes especies, desde animales complejos como simios, ratones, conejos hasta organismos más simples como *Caenorhabditis elegans*, un nemátodo que conserva más de 19,000 genes homólogos en humano y *D. melanogaster*, mejor conocida como “la mosca de la fruta”, que tiene una alta similitud con el ser humano, ya que el genoma de la mosca cuenta con alrededor del 75% de los genes relacionados con enfermedades metabólicas desarrolladas en humanos. Esta es la razón por la cual la mosca de la fruta ha sido utilizada por años como modelo de estudio para una amplia variedad de enfermedades humanas entre ellas la DM2 (Chatterjee & Perrimon, 2021).

2.5.1 *Drosophila melanogaster* como modelo de obesidad

Desde principios del siglo pasado, Thomas Hunt Morgan convirtió a la mosca de la fruta en un ícono de estudios genéticos, a partir de sus estudios de la teoría cromosómica de la herencia y el entrecruzamiento cromosómico evidenciando el empleo de *D. melanogaster* como organismo genético modelo para el estudio de distintos mecanismos moleculares críticos de un sinnúmero de fisiopatologías reproducibles en humanos (Morgan, 1910). Actualmente, *D. melanogaster* ha incitado un particular interés como sistema para el estudio de la obesidad y enfermedades metabólicas, ya que tiene una gran analogía genética en el trastorno metabólico en humanos, además se han caracterizado sistemas análogos

asociados a estas enfermedades desde genes, tejidos y órganos (Musselman & Kühnlein, 2018).

En 1960 se aisló por primera vez una mutante de mosca obesa, que permitió demostrar que el sistema fisiológico de *D. melanogaster* le permite regular la ingesta de alimentos y desarrollar obesidad tras el almacenamiento excesivo de grasa adiposa de manera análoga a los mamíferos (Doane, 1960). Una dieta rica en carbohidratos y grasas es un factor que influye en la obesidad de moscas al igual que en humanos. El exceso energético es almacenado en forma de lípidos y glucógeno en el cuerpo graso de la mosca, un órgano equivalente al tejido adiposo en mamíferos, este tejido representa el centro metabólico del insecto y es el principal órgano de almacenamiento de lípidos, estos son acumulados en orgánulos especializados llamados gotas de lípidos (Gáliková & Klepsatel, 2018).

Debido a que los triglicéridos (TAG) son la principal forma de almacenamiento de lípidos en la mosca, su cuantificación se ha utilizado para definir la obesidad (Musselman & Kühnlein, 2018).

Se han empleado diferentes métodos para cuantificar la cantidad de lípidos almacenados, uno de ellos es la cuantificación colorimétrica de animales enteros o tejidos disecados y el uso de tintes lipofílicos como el rojo Nilo para visualizar lípidos neutros dentro de las células (Tennessee, *et al.*, 2014). A nivel celular la obesidad se ha caracterizado mediante la cuantificación del tamaño y número de gotas de lípidos en el cuerpo graso de la mosca (Musselman, *et al.*, 2011).

Una dieta rica en grasas (HFD), estimula la obesidad en moscas, acompañada de alteraciones metabólicas como hiperglucemia y complicaciones fisiopatológicas características de la diabetes. La acumulación de grasa ectópica en moscas con dieta HFD, conduce a una sobre activación de la respuesta inmune que aumenta la señalización TGF- β (Woodcock, *et al.*, 2015) y que conduce al desarrollo de resistencia a la insulina a partir de la alteración en la cascada de señalización (Hong, Kang, & Yu, 2016). Así mismo, la obesidad desencadenada por HFD, parece conducir a un mecanismo de disfunciones cardíacas en moscas, acortando su tiempo de vida (Pulinilkunnil, *et al.*, 2014). El modelo HFD en moscas ha contribuido

eficazmente al estudio de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (Gáliková & Klepsatel, 2018).

Por otra parte, la dieta alta en azúcar (HSD) se declara el tratamiento preferencial para inducir obesidad en la mosca, debido a que representa una fuente natural de alimento para *D. melanogaster* por lo que tiene una mayor inclinación por este tipo de sustrato. La dieta HSD es apta para promover obesidad en la mosca produciendo un incremento del 50 al 150% en el contenido de grasa, a la par estimula el incremento hiperglucémico y disminuye la expresión de péptidos similares a la insulina (*Dilps*), evento asociado a resistencia a la insulina en la mosca. El tratamiento HSD se ha visto asociado con diversas alteraciones fisiopatológicas en la mosca, por una parte, promueve una disfunción de los nefrocitos pericárdicos (órgano análogo a los podocitos del riñón en mamíferos), también se atribuye el efecto de trastornos cardiacos progresivos dependientes del flujo de hexosamina y por último se ha vinculado a deficiencias en el desarrollo larvario y acortamiento de la vida útil (Gáliková & Klepsatel, 2018).

Gracias al aislamiento de moscas obesas, se ha logrado identificar genes asociados a la obesidad en *D. melanogaster* que regulan el almacenamiento de lípidos, tal es el caso del gen *adipose*, identificado en el 2003, que es un homólogo del gen que codifica para la proteína WDTC1 en mamíferos encargado de controlar la acumulación de grasa corporal (Häder *et al.*, 2003). Actualmente se cuenta con colecciones de variantes genéticas elaboradas en laboratorio, para evaluar el efecto genético en la obesidad (Musselman & Kühnlein, 2018).

2.5.2 *Drosophila melanogaster* como modelo de diabetes

En la mosca, al igual que en humanos, el sistema metabólico es regulado por hormonas neuroendocrinas. La hormona adipocinética AKH, homóloga al glucagón, es secretado por células productoras de la hormona adipocinética neuroendocrina (APC). AKH estimula los procesos catabólicos y la producción de glucosa y trehalosa para activar la movilización de energía. *D. melanogaster* también presenta péptidos similares a la insulina denominados dilp1-7 o Ilp, su genoma codifica para siete péptidos homólogos que son secretados por un grupo de células

neuroendócrinas productoras de insulina (IPC) que se encuentran en la parte anterior del sistema nervioso central (SNC). Estas hormonas son liberadas en la hemolinfa y bombeadas por el vaso dorsal de la mosca que permite que circulen y actúen sobre sus tejidos diana como músculo, cuerpo graso y oenocitos (equivalente hepático) (Musselman & Kühnlein, 2018).

D. melanogaster ha conservado de forma evolutiva la vía de señalización de la insulina, tiene proteínas homologas que desencadena toda la cascada y regulan de forma efectiva el metabolismo y crecimiento, permitiendo aprovechar el almacenaje de nutrientes. Dicha cascada inicia tras la activación del receptor InR, por la unión de los dilps, InR se autofosforila promoviendo la unión de Chico que es el homólogo del sustrato del receptor de insulina, induciendo la unión de PI3K y reorganizando la subunidad catalítica Dp110 en la membrana, donde fosforila al fosfolípido PIP2 convirtiéndolo en PIP3, esto promueve el reclutamiento de PDK y AKT a la membrana y la posterior activación por fosforilación de AKT, enzima que se ve implicada en diferentes procesos celulares a partir de varias dianas como Rheb, TOR, S6K, GSK3 que controla el desarrollo de la mosca y los niveles de glucosa y trehalosa (principal disacárido en la mosca) en la hemolinfa (Murillo-Maldonado & Riesgo-Escovar, 2017).

En la mosca, la vía catabólica contraria a la de la insulina es la equivalente a la vía del glucagón, es regulada en el cuerpo graso donde tiene su receptor afín, inicia cuando la hormona AKH se une a sus receptores acoplados a proteínas G, esto desencadena la producción de AMPc que promueve la activación del factor de transcripción CREB. Se sabe que la inhibición de CREB en la mosca induce obesidad (Musselman & Kühnlein, 2018). En *D. melanogaster*, una dieta rica en grasas genera una serie de complicaciones fisiopatológicas características a la obesidad en humanos como hiperglucemia que resultan en una actividad defectuosa de la vía de la insulina y que promueven el desarrollo del síndrome metabólico característico de diabéticos (Na, *et al.*, 2015).

Por otra parte, moscas con mutaciones en genes que codifican para diferentes proteínas de la vía de señalización de la insulina, presentan alteraciones

patológicas semejantes a las observadas en personas diabéticas como la retinopatía y neuropatía, esto refleja su efecto a nivel fenotípico y sostiene su aplicación como modelo de estudio para DM2 (Murillo-Maldonado, et al., 2011).

2.5.3 Ventajas de *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

D. melanogaster es un díptero braquícero perteneciente a la familia Drosophilidae. Posee cuatro fases en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo de vida es dependiente de las condiciones, a 25 °C su ciclo dura 10 días, sin embargo, puede acelerarse en temperaturas aumentadas o prolongarse a temperaturas bajas. El tiempo de generación relativamente corto y el alto grado de proliferación de la progenie representan una gran ventaja sobre otros animales modelos de laboratorio como ratones, conejos, primates u otros mamíferos. Su facilidad de crianza y manejo en el laboratorio es otra de las razones por las que *D. melanogaster* es selecta como modelo, ya que su tamaño de aproximadamente 3 mm facilita su manipulación y es suficiente para identificar características morfológicas y alteraciones fisiológicas. *D. melanogaster* posee 4 pares de cromosomas uno X/Y, y tres autosomas, este número reducido de cromosomas facilita su mapeo e interpretación. Su genoma fue secuenciado en el 2000 por la compañía Celera Genomics, donde se reconocieron aproximadamente 139,5 millones de pares de bases (Chatterjee & Perrimon, 2021).

Debido a esta alta conservación genética con mamíferos, *D. melanogaster* se ha convertido en un modelo ideal para explorar las bases metabólicas de enfermedades humanas como diabetes, obesidad y cáncer (Li & Tennessen, 2018). A pesar de que se reconoce que la obesidad promueve alteraciones metabólicas asociadas a la resistencia a la insulina que desembocan en el aumento de la predisposición para desarrollar DM2, hasta el momento no se ha logrado dilucidar por completo los mecanismos moleculares que subyacen esta transición, por lo tanto, caracterizar la transición de obesidad a la resistencia a la insulina proveerá de mayor conocimiento para entender la fisiopatología de la enfermedad.

El empleo de una herramienta metabolómica combinado con intervenciones dietéticas, permitirán explorar el metabolismo intermediario y revelar interacciones

complejas entre la dieta y el genotipo para descubrir nuevos mecanismos enzimáticos y descifrar conexiones entre vías metabólicas que puedan explicar la fisiopatología de la enfermedad (Tennesen, *et al.*, 2014; Li & Tennesen, 2019).

Actualmente, el potencial uso de *D. melanogaster* como modelo para el estudio de trastornos metabólicos asociados a la DM2 proporciona ventajas sobre la investigación y permite explorar diferentes enfoques asociados al mecanismo de patogenicidad, con la finalidad de explorar biomarcadores que faciliten el diagnóstico temprano y encontrar dianas terapéuticas que ayuden a combatir la enfermedad y mejorar la calidad de vida.

3 Hipótesis

La transición de obesidad-resistencia a la insulina conlleva a cambios metabólicos en *Drosophila melanogaster*, los cuales caracterizan compuestos identificados mediante análisis metabolómicos, y estos son posibles biomarcadores predictivos de diagnóstico temprano de DM2 asociado a la obesidad.

4 Objetivos

4.1 General

Caracterizar la transición obesidad-resistencia a la insulina por medio de un enfoque metabolómico y quimiométrico usando como modelo a *Drosophila melanogaster*.

4.2 Particulares

- Implementar el modelo de *D. melanogaster* para el estudio de la transición obesidad-resistencia a la insulina.
- Evaluar los cambios en los perfiles metabolómicos de *D. melanogaster* inducidas a obesidad y resistencia a la insulina.
- Identificar biomarcadores candidatos para el diagnóstico preventivo de la diabetes mellitus tipo 2.

5 Metodología

5.1 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo experimental.

5.1.1 Definición del universo

Los objetos de estudio fueron moscas pertenecientes a la especie *D. melanogaster*, de la cepa silvestre Oregon R (ORR) exclusivamente machos. Se dividieron en dos grupos, el grupo sano a base de una dieta estándar y el grupo enfermo que fue inducido a obesidad con una dieta obesogénica.

5.1.2 Tamaño de la muestra

El grupo control estuvo conformado por moscas de la cepa silvestre ORR machos adultos alimentadas con una dieta estándar (SD) y un grupo enfermo, el cual incluyó a moscas ORR machos adultos alimentadas con una dieta alta en azúcares (HSD), y se mantuvieron en tratamiento durante 14 días. El tamaño de muestra fue por conveniencia dependiendo de los procedimientos. Para las determinaciones bioquímicas se recolectaron moscas de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de tratamiento para cada grupo. Para la determinación de triglicéridos se requirieron grupos de 5 moscas con repetitividad de 10 veces para cada uno de los tiempos y grupos de tratamiento. Para la determinación de glucosa+trehalosa se requirieron grupos de 50 moscas con una repetitividad de 5 veces para cada tiempo y grupo de tratamiento. Para medir la expresión de Dilps se requirieron grupos de 20 moscas con una repetitividad de 5 veces para cada día de tratamiento y grupo respectivamente. Finalmente, para la determinación metabólica se recolectaron

grupos de 10 moscas con una repetitividad de 5 veces para cada tiempo y grupo de tratamiento.

5.1.3 Criterios de inclusión

Los integrantes de cada grupo fueron moscas silvestres de la cepa ORR macho adultas recolectadas el mismo día con el mismo tiempo de emergidas de la pupa.

5.1.4 Criterios de exclusión

En este estudio se excluyeron moscas hembra ya que sus ciclos y cambios hormonales pueden alterar los parámetros metabólicos. Se excluyeron moscas macho de aspecto deteriorado, tamaño reducido, extremidades acortadas, tórax aplastado, cuerpo seco y moscas muertas.

5.1.5 Definición de unidades de medidas

La definición de unidades de medidas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Unidades de medidas bioquímicas.

Variable	Unidades	Tipo
Sobrevivencia	%	Cuantitativa continua
Peso corporal	Mg	Cuantitativa continua
Triglicéridos	µg/mg	Cuantitativa continua
Glucosa + trehalosa	mg/dL	Cuantitativa continua
<i>Dilp2</i>	Expresión relativa	Semicuantitativa continua
Perfil de metabolitos	Intensidad normalizada	Semicuantitativa continua

5.2 Inducción de obesidad en mosca macho adultos

5.2.1 Cepa de *Drosophila melanogaster*

Los ejemplares de *D. melanogaster* empleados para esta investigación pertenecen a la cepa silvestre Oregon R (ORR), los grupos de moscas se mantuvieron en viales

bajo condiciones estándar a 25° C, 50% de humedad relativa, ciclos de luz / oscuridad de 12/12 h en viales con medio de comida estándar (SD).

5.2.2 Dieta estándar

La composición de la dieta (SD) fue un tratamiento a base de fructosa al 9%. El procedimiento para la preparación de un litro de comida estándar consistió en pesar los ingredientes (Tabla 2) y añadirlos uno por uno en el siguiente orden: agar, fructosa y agua en un vaso de precipitado. La mezcla se homogenizó por completo y se calentó sin hervir durante 10 minutos. Posteriormente se añadió la levadura y se volvió a homogenizar. La mezcla se esterilizó en autoclave a 121 °C, por 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar la mezcla a 40°C aproximadamente y se añadieron los ingredientes faltantes (grenetina y ácido propiónico). Por último, se vació la comida en los viales estériles, se dejó solidificar y se les colocó un tapón de algodón.

Tabla 2. Composición de la dieta estándar de *D. melanogaster*

Ingredientes	Cantidad
Fructosa	90 g
Agar	16 g
Levadura inactiva	100 g
Grenetina	14 g
Ácido propiónico	10 mL
Agua	616 mL

[†]Para la preparación de 1 L de alimento estándar.

5.2.3 Dieta alta en grasas (HFD)

Para inducir la obesidad, las moscas fueron alimentadas con una dieta rica en grasas (HFD) según lo reportado anteriormente por Hong, et al., 2016. Esta dieta fue preparada por la adición de 15% de aceite de coco a la dieta normal estándar. El procedimiento para la preparación de la dieta HFD fue el mismo que el de la comida estándar, pero agregando 30 g de aceite de coco antes de esterilizar. Para evitar la letalidad debido a las condiciones pegajosas de la dieta rica en grasa, a

los viales con el alimento se les añadió un trozo de papel absorbente de 1 cm x 2 cm y se les mantuvo en posición inclinada durante todo el tratamiento.

5.2.4 Dieta alta en azúcares (HSD)

Se modificó la HFD por una dieta HSD, la cual se preparó adicionando un 30% de fructosa en lugar del 9% de la comida SD. Como se ha mencionado en estudios anteriores, esta dieta es suficiente para estimular obesidad crónica en las moscas (Gáliková & Klepsatel, 2018). El procedimiento consistió en adicionar 300g de fructosa junto con la mezcla de levadura y agar, la adición de agua se ajustó al contenido total de 1 litro de comida, se homogenizó y calentó hasta el punto de ebullición donde posteriormente se llevó a la autoclave para su esterilización basándose en el protocolo de preparación de comida estándar.

5.3 Variables bioquímicas

Se recolectaron moscas macho adultas ORR recién emergidas de la pupa y se mantuvieron en comida estándar durante tres días, posteriormente se cambiaron de vial y se sometieron a su respectivo tratamiento durante 14 días con una dieta HFD, HSD o estándar. Para determinar el fenotipo de obesidad se realizó la cuantificación de TAG. Para evaluar hiperglucemias en *D. melanogaster* se realizó la cuantificación de glucosa+trehalosa en hemolinfa por un método espectrofotométrico. La resistencia a la insulina fue evaluada mediante la determinación de la expresión de *dilp2* de acuerdo con lo reportado (Hong, et al., 2016).

5.3.1 Evaluación de la supervivencia

La supervivencia de las moscas de los grupos de tratamiento SD, HFD y HSD se registró al final del experimento, correspondiente al día 14 de tratamiento. Se registró el número de moscas muertas por vial y se calculó el porcentaje de supervivencia media total por grupo experimental.

5.3.2 Medición del peso corporal de las moscas

Se evaluó el peso corporal de las moscas alimentadas con SD, HFD o HSD. El registro se realizó los días 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 14 de tratamiento. Para las mediciones,

se transfirieron cinco moscas a un tubo vacío previamente tarado y se determinó el peso del grupo de moscas en una microbalanza analítica. Se calculó el peso corporal medio de 5 moscas. Los resultados se expresaron en mg de peso corporal como el valor medio de 10 repeticiones biológicas.

5.3.3 Determinación de triglicéridos totales

Se realizó la determinación de triglicéridos totales de acuerdo a las instrucciones del kit Triglyceride SPINREACT. El análisis se realizó de las moscas completas tratadas durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 días con las dietas SD, HFD o HSD.

Se tomaron 5 moscas de cada grupo experimental, se anestesiaron en hielo y se homogenizaron con un pistilo de plástico en 100 µl de PBST (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.14 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20, 1.76mM KH₂PO₄, pH 7.4) y se incubaron inmediatamente a 70° C por 5 min. A continuación se agregaron 25 µl de cada muestra en una microplaca de 96 pocillos y se adicionaron 250 µl del reactivo (Triglicéridos-LQ, Spinreact). Para el blanco se añadieron únicamente 250 µl del reactivo y para el patrón se añadieron 250 µl del reactivo y 25 µl del patrón (200 mg/dL).

Todos los tubos se incubaron a 37 ° C por 5 min. Se midió la absorbancia a 505 nm por espectrofotometría en un lector de microplacas (Multiskan G0, Thermo Scientific) y se determinó la concentración total de triglicéridos con respecto a la lectura de absorbancia del patrón y la muestra frente al blanco de reactivo. El resultado final se normalizó dividiendo la concentración total de triglicéridos entre el peso de cada grupo de moscas y los resultados se expresaron como µg de triglicéridos por mg de peso corporal como el valor medio de 10 repeticiones biológicas.

5.3.4 Determinación de glucosa+trehalosa en hemolinfa

La determinación del contenido de glucosa+trehalosa en muestras de hemolinfa de moscas se realizó a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de tratamiento con SD o HSD. Para el análisis se recolectaron 45 moscas adultas ORR machos de ambos grupos,

las cuales fueron anestesiadas en hielo y decapitadas cuidadosamente, sin perforar el cuerpo de la mosca.

Para recolectar la hemolinfa los cuerpos se colocaron en un tubo eppendorf de 0.5 ml perforado en la parte inferior del tubo con una aguja y se colocó dentro de otro tubo eppendorf de 1.5ml (tubo colector). Los tubos se centrifugaron a 9000 g por 5 min a 4°C. Se tomó una alícuota de 1 µl de la hemolinfa recolectada y se diluyó con 99 µl de buffer de trehalasa (5mM Tris, 137mM NaCl y 2.7mM KCl, pH 6.6). Las muestras se incubaron durante 5 min a 70 °C para inactivar las enzimas endógenas. A 50 µl de cada muestra se le agregaron 0.05 U de trehalasa (Sigma, T8778). La trehalasa se agregó al extracto para digerir la trehalosa en glucosa libre. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 37°C para permitir la descomposición de la trehalosa en glucosa libre.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 5 min, se tomaron 30 µl del sobrenadante y se colocaron en una microplaca de 96 pozos. Por último, se agregaron 250 µl del reactivo de glucosa (kit GLUCOSE –LQ SPINREACT) y se incubó por 10 min a 37°C. Se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Multiskan G0, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como mg de glucosa+trehalosa por dL de hemolinfa como el valor medio de 5 repeticiones biológicas.

5.4 Determinación de la expresión de *Dilp2*

Para conocer el estado de resistencia a la insulina se realizó la determinación de la expresión del péptido similar a la insulina 2 en *Drosophila* (*Dilp2*), homólogo a la insulina, mediante la técnica de RT-PCRq. La determinación se realizó de las moscas alimentadas con SD o HSD durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 días de tratamiento.

5.4.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Para las muestras se seleccionaron 20 moscas de cada grupo experimental y se anestesiaron y decapitaron para recolectar las cabezas (lugar donde se expresa

Dilp2). Cada muestra se homogenizó con 500 µl de trizol con la ayuda de un pistilo, en tubos eppendorf. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y posteriormente se agregaron 100 µl de cloroformo (se mezcló con vortex). Nuevamente se incubaron a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugaron a 4°C por 15 min a 12,000 g. La fracción acuosa resultante se transfirió a otro tubo y se agregaron 200 µl de isopropanol frío (se mezcló por inversión). Se incubaron en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugaron a 4°C por 15 min a 12,000 g. El sobrenadante resultante se retiró y se añadieron 300 µl de etanol al 75% (se mezcló por inversión), posteriormente se centrifugó a 4°C por 10 min a 12,000 g (este paso se repitió dos veces). Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el tubo por 20 min. Por último, la muestra se resuspendió en 20 µl de agua con inhibidores de RNAsa y se incubó a 55°C con agitación durante 10 min con tapa cerrada, se conservaron en hielo.

La integridad de la muestra de RNA se evaluó por medio de la corrida electroforética de la muestra en gel de agarosa al 1% (0.3g agarosa en 30 ml TAE. En cada carril se cargaron 7 µl de agua miliQ, 2 µl de buffer de carga y 1µl de la muestra y se corrió a 90 volts por 35min. El ARN se cuantificó a 260 nm en un Nanodrop (Multiskan G0, Thermo Scientific). La pureza del ARN se evaluó con las proporciones 260: 280 y 260: 320.

5.4.2 Retrotranscripción

Se sintetizó cDNA a partir del RNA extraído de cada muestra, con el uso de una transcriptasa inversa, se añadieron 0.5 µl de oligo dT por cada 1 µl de RNA (dependiendo de la concentración de cada muestra), agua libre de RNAsas hasta llegar a un volumen de 15 µl. Posteriormente se calentó el tubo a 70°C por 5 min en un Thermal Cycler C100 Touch, una vez caliente se pasó a hielo inmediatamente. Se adicionaron 5µl del buffer de reacción M-MLV 5X (Promega), 1.25 µl de dNTP mix 10 mM (Promega), 0.7 µl del inhibidor de RNAasa (Promega),

1 µl de M-MLV RT (Promega) y finalmente agua libre de RNAsas hasta un volumen de 25 µl. Se mezcló e incubó a 37 °C por 60 min.

5.4.3 Análisis cuantitativo mediante RT- PCRq

El análisis cuantitativo se realizó mediante PCRq (reacción en cadena de la polimerasa) usando el reactivo Syber Green. Se utilizaron oligos específicos para *Dilp2* (homólogo de insulina en la mosca) y el gen endógenos actina 5 (*Act5C*) específico de actina en *D. melanogaster* a una concentración de 10 mM (Tabla 3).

Tabla 3. Oligos para el análisis por PCRq

Oligos	Secuencia 5`-3`
<i>Dilp2- Forward</i>	GTATGGTGTGCGAGGAGTAT
<i>Dilp2- REVERSE</i>	TGAGTACACCCCAAGATAG
<i>Act5C- Forward</i>	CACACCAAATCTTACAAAATGTGTGA
<i>Act5C- REVERSE</i>	AATCCGGCCTTGACATG

Dilp2: péptido similar a la insulina en *Drosophila*; *Act5C*: actina 5C.

El protocolo se llevó a cabo como se describe a continuación: la mezcla de PCR se preparó en un tubo de reacción de 1.5 ml en hielo para una reacción de 20 µl.

Para cada reacción se prepararon 3 µl de agua grado PCR y 2 µl de PCR primer (concentración 10X). Se mezcló cuidadosamente y se pipetearon 15 µl de la PCR mix (Roche) en cada recipiente de reacción en una placa de pocillos Light cycler (Roche Diagnostics), a cada pocillo se le añadieron 5 µl de la plantilla de ADN y se colocó en una centrifuga de cubeta ascilante estándar con un adaptador adecuado. Se centrifugó a 1500 g durante 2 min. Los ciclos de PCR se realizaron como se escribe en la Tabla 4. La expresión relativa del ARNm de *Dilp2* se calculó mediante normalización frente a *Act5c* usando el método 2-DDCt (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 4. Ciclos de amplificación para RT- PCRq

Programa	Temperatura (°C)	RAMP (°C/seg)	Duración (seg)	Modo ^d
Preincubación	95	4.4	600	Ninguna
Amplificación (3 pasos) 45 ciclos	95	4.4	10	Ninguna
	54	2.2	10	Ninguna
	72	4.4	10	Ninguna
Melting	95	4.4	10	Ninguna
	65	2.2	10	Ninguna
	97	0.1	10	5 lecturas

5.5 Análisis lipidómico

5.5.1. Preparación de la muestra

Para el análisis lipídico se emplearon grupos de 10 moscas de cada grupo experimental (SD o HSD) durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 o 14 días. Cada muestra se macero con nitrógeno líquido y se recolectó en tubos eppendorf de 1.5 ml, para posteriormente pesarlos en una microbalanza analítica.

A cada muestra se le agregaron 1.6 mL de metanol: agua (80:20 v/v) y se sonificaron por 10 min a temperatura ambiente (08895-75, Cole-Palmer). Posteriormente se centrifugó por 15 min a 5000 g a 25 °C y el sobrenadante fue recuperado en un eppendorf donde se concentraron mediante el uso de un concentrador al vacío (SpeedVac, ThermoFisherScientific) a 35 °C por 24 h. Para re-suspender la muestra se agregaron 200 µL de metanol grado masas y el tubo se homogenizó en el vortex por 30 s. Se centrifugó por 10 min a 5 000 g a 25 °C. Finalmente, los sobrenadantes se pasaron a través de filtros de jeringa de PVDF (0,45 mm, 13 mm) y se recogieron en viales cromatográficos ámbar con insertos de vidrio. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

5.5.2 Análisis por UPLC-ESI-QToF MSE

Cada muestra fue inyectada (1 μ L) en modo de circuito completo en una columna Acquity BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m) instalada en un cromatógrafo líquido de ultra rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo/tiempo de vuelo con una fuente de ionización por electropulverización a presión atmosférica (UPLC-ESI-QTOF MS, Vion, Waters Co.). Las muestras de control de calidad (QC) se prepararon agrupando un volumen idéntico (1 μ L) de cada muestra, mientras que las muestras en blanco se prepararon utilizando los solventes de extracción (metanol:agua 80:20 v/v). Se realizaron tres inyecciones de blanco consecutivas (fase móvil) previas a la secuencia analítica para el acondicionamiento del sistema. Se inyectaron muestras en blanco de QC y solvente cada 10 muestras biológicas para asegurar la estabilidad de las condiciones analíticas. Todas las muestras se mantuvieron en el automuestreador a 4 °C, mientras que la columna se mantuvo a 35 °C durante todo el análisis. La fase móvil consistió en: (A) agua: ácido fórmico 99:1 (v/v) y (B) acetonitrilo:ácido fórmico 99:1 (v/v) a 0,4 mL/min en condiciones de gradiente según lo reportado por Álvarez- Rodríguez et al. (2020).

Tabla 5. Condiciones de gradiente de la fase móvil del UPLC-ESI-qToF MS^E

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	95	5
3	85	15
5	50	50
9	5	95
12	5	95
13	95	5
15	95	5

Fase (A) agua: ácido fórmico 99:1 (v/v); fase (B) acetonitrilo:ácido fórmico 99:1 (v/v).

La ionización se realizó en modo negativo (ESI-) a 2 kV y 120 °C. Los espectros de MS se recolectaron en un rango de masas de 100-1500 Da, utilizando una energía de colisión baja de 5 eV y una alta energía de colisión de 15-45 eV en modo

centroide con un tiempo de ciclo de trabajo de 0,2 s. Se infundió leucina-encefalina (50 pg/mL) a un caudal de 10 μ L/min cada 5 min para la corrección de la masa bloqueada.

5.6 Análisis de datos

5.6.1 Análisis de perfil metabólico

Los datos se adquirieron y procesaron usando el software UNIFI (Waters Co.) con un enfoque objetivo con iones moleculares y de fragmentos seleccionados usando un error de masa <5 ppm. Los datos se normalizaron utilizando la abundancia total de iones para reducir el sesgo sistemático dentro del experimento. Luego, los datos se transformaron con la raíz cuadrada y se escalaron en Pareto. Los lípidos se etiquetaron según la nomenclatura utilizada por la base de datos LipidMaps sin especificar la posición de los dobles enlaces carbono-carbono ni la posición de la cadena de ácidos grasos de la molécula de glicerol, ya que estas características no se pudieron diferenciar en el patrón de fragmentación obtenido en los espectros de masas.

5.6.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico univariado de los parámetros bioquímicos (glucosa+trehalosa y triglicéridos) entre los grupos experimentales. Los valores atípicos (>1,5 QR) y los valores extremos (>3,0 QR) se identificaron mediante diagramas de caja y patillas y se excluyeron los valores extremos. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para la evaluación de la normalidad y la prueba de Levene para la evaluación de la homogeneidad de la varianza. Luego, se realizó la comparación de medias con la prueba de Dunnet contra el control (SD) para variables paramétricas y con la prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas en cada tiempo de experimentación. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron significativas. Todos los análisis estadísticos univariados se llevaron a cabo en el software JMP.

Se realizó un análisis multivariado del perfil lipidómico y se construyeron los gráficos por medio de análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y k-medias realizando la validación correspondiente con datos lipidómicos para cada tiempo de muestreo (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días). Asimismo, se obtuvieron los gráficos de de Importancia de las variables en la proyección (VIP) de los modelos de PLS-DA. Todos los análisis multivariados se realizaron utilizando el software en línea Metaboanalyst 5.0.

6. Resultados

6.1 Viabilidad de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares

Con la finalidad de inducir obesidad crónica en *Drosophila melanogaster*, se evaluaron dos tipos de tratamiento obesogénico: una dieta HFD adicionada con aceite de coco al 15% y una dieta HSD adicionada con fructosa al 30%. Se determinó la viabilidad de las moscas midiendo el porcentaje de supervivencia posterior a los 14 días de tratamiento, comparando el grupo control y el grupo enfermo para los dos tipos de tratamiento: HFD y HSD respectivamente (Figura 3).

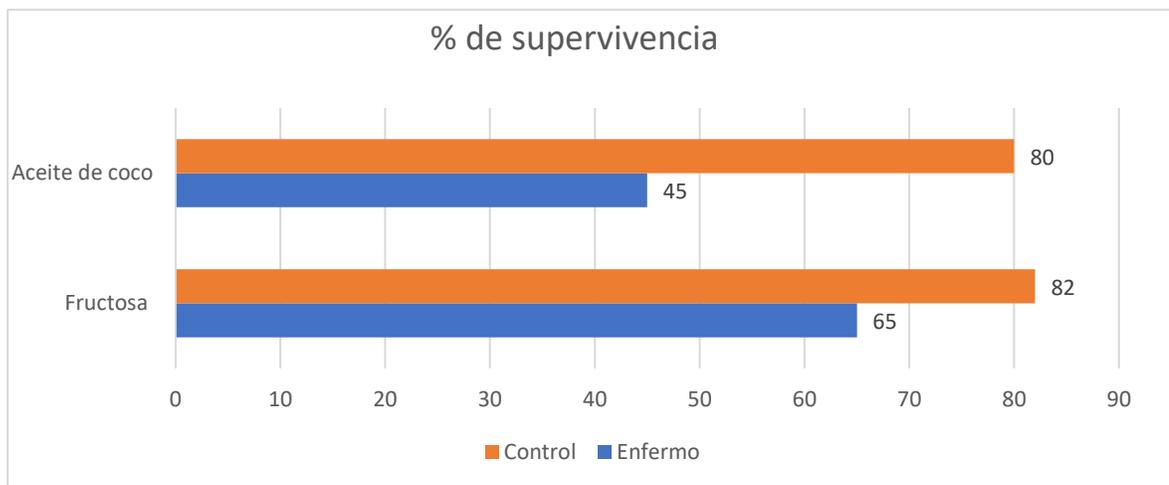


Figura 3. Efecto de la administración de una dieta alta en grasa o en azúcares durante 14 días en la supervivencia de *D. melanogaster*.

Se observó una viabilidad del 65% en moscas tratadas con la dieta HSD, que corresponden a una disminución del 20.7% con respecto al 100% de la viabilidad del grupo control. Esta cifra se encuentra dentro de los parámetros de reducción observados en estudios previos con tratamientos HSD en moscas (Gáliková & Klepsatel, 2018). Sin embargo, para el tratamiento HFD con aceite de coco al 15% se muestra una disminución del 43.7% con respecto al 100% de la viabilidad del grupo control (Fig. 3). Se ha reportado que las condiciones generadas por la adición

de aceite de coco al medio HFD, pueden reducir drásticamente la motilidad de las moscas que está directamente relacionado con una reducción en su viabilidad (Gáliková & Klepsatel, 2018).

6.2 Peso corporal de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares

Se determinó el peso corporal de moscas tratadas con una dieta HFD y una dieta HSD y se realizó una comparación con su respectivo grupo control. Con base en los resultados, tras una evaluación estadística por la prueba de Dunnet, se observó una tendencia inalterable en la mayoría de los grupos analizados.

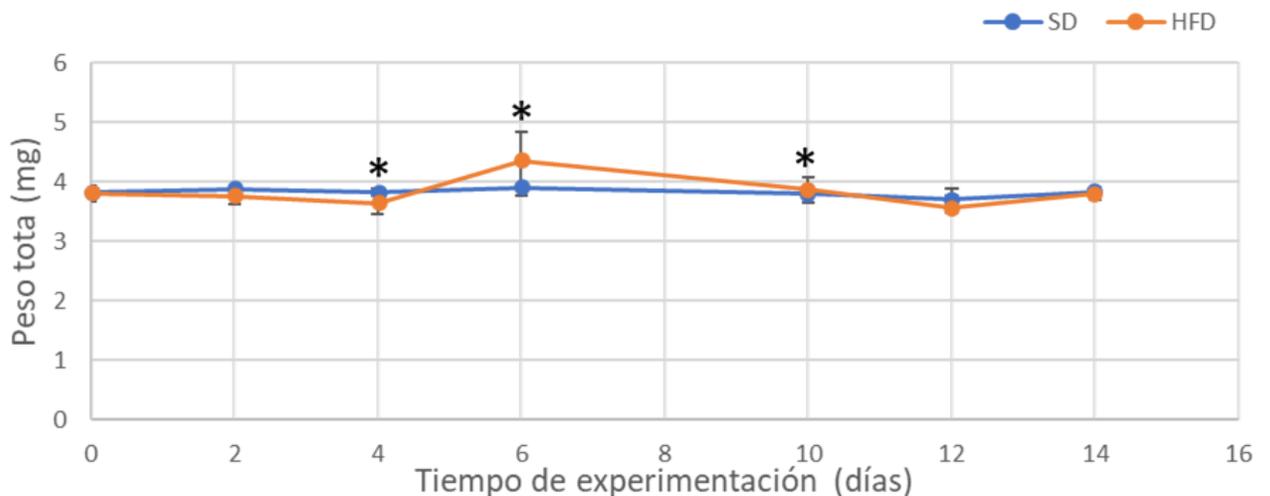


Figura 4. Efecto de la administración de una dieta alta en grasa durante 14 días en el peso corporal de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 10 réplicas en grupos de 5 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HFD: dieta alta en grasas.

Se observó únicamente una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo enfermo los días 6 y 10 para el grupo HFD, mientras que en el grupo HSD únicamente observados diferencia significativa en el tiempo 10 y 14 días (Figura 4 y Figura 5).

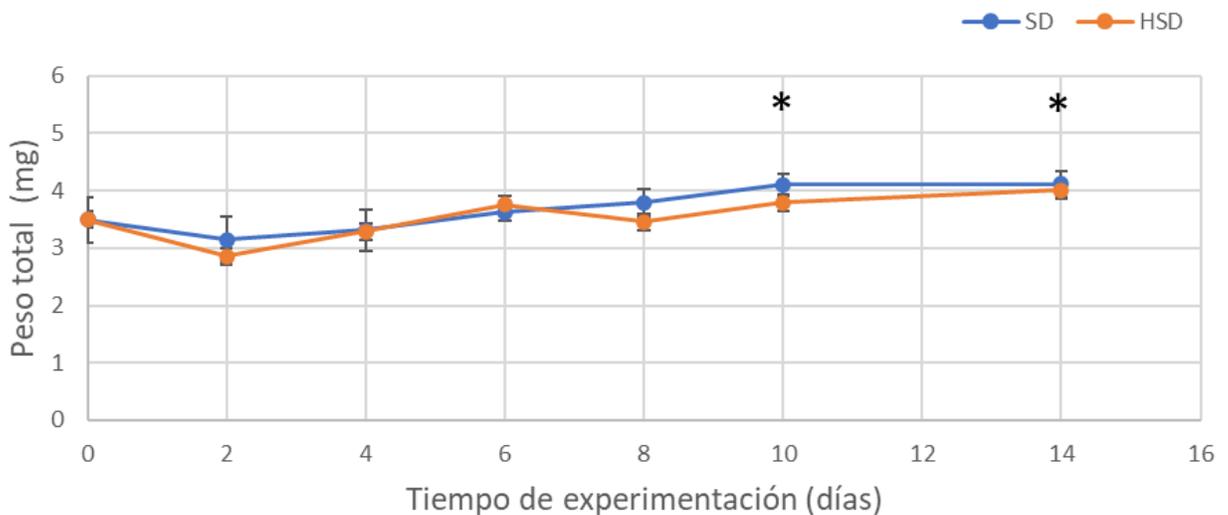


Figura 5. Efecto de la administración de una dieta alta en azúcares durante 14 días en el peso corporal de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 10 réplicas en grupos de 5 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HSD: dieta alta en azúcares.

6.3 Triglicéridos totales de moscas tratadas con una dieta alta en grasa y una dieta alta en azúcares

Para evaluar la obesidad en *Drosophila melanogaster* se realizó la determinación de triglicéridos totales, haciendo una comparación entre el grupo de moscas que recibieron un tratamiento obesogénico (HSD y HFD) con respecto al grupo control (SD; Figura 6 y Figura 7). En primer lugar, se evaluó la capacidad del tratamiento HFD adicionado con aceite de coco al 15% para inducir obesidad en las moscas (Figura 6). Únicamente se observó una diferencia significativa en el día 6 de tratamiento HFD, los demás grupos de estudio no presentaron diferencias con significancia estadística. Los resultados presentados muestran una tendencia a presentar niveles de triglicéridos más altos en moscas tratadas HFD en comparación con el grupo control, no obstante, estos cambios no son significativos. Los resultados presentan una fluctuación similar en los niveles de triglicéridos en ambos grupos de tratamiento (HFD versus SD), y una clara disminución después del día 6 de tratamiento para ambos grupos. Los resultados anteriores muestran

que, al menos en estas condiciones, no se logró inducir una obesidad crónica con la administración de una dieta rica en grasas en *D. melanogaster*.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la capacidad del tratamiento HSD para inducir obesidad en *Drosophila melanogaster*, se determinaron los niveles de triglicéridos totales de moscas alimentadas con HSD comparadas con el grupo control (Figura 7). Los resultados presentan, un incremento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de triglicéridos en moscas tratadas con la dieta HSD desde el día 2 después de iniciado el tratamiento. Dicha tendencia creciente se mantuvo constante hasta el último día de registro (14 días) con un incremento de hasta el 23% con respecto al grupo control. Por lo tanto, el tratamiento con la dieta HSD resultó en la inducción de un estado de obesidad en *Drosophila melanogaster*. Este modelo fue utilizado para los experimentos sucesivos.

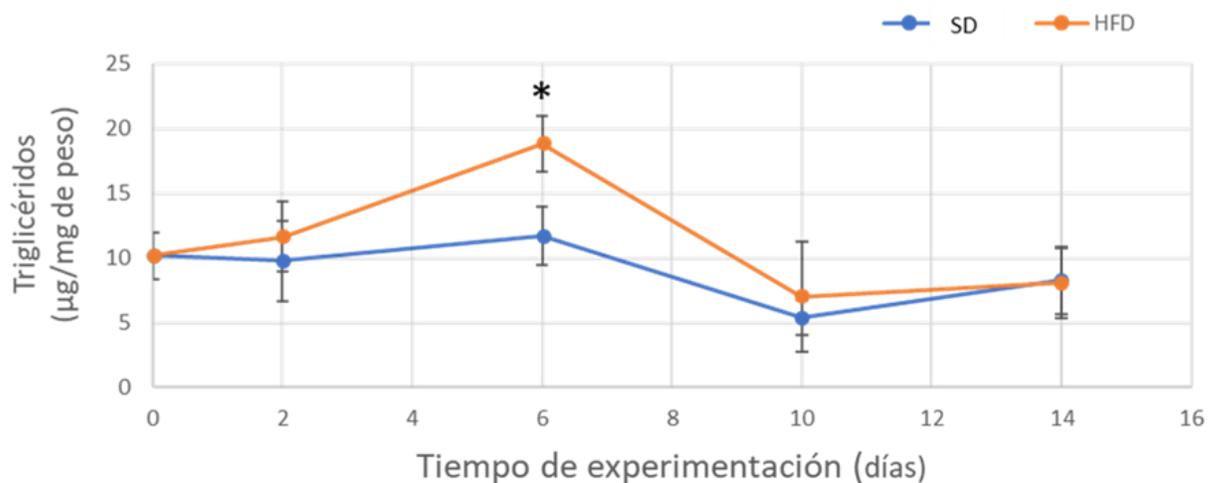


Figura 6. Efecto de la administración de una dieta alta en grasa durante 14 días en los niveles de triglicéridos totales de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 10 réplicas en grupos de 5 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HFD: dieta alta en grasa.

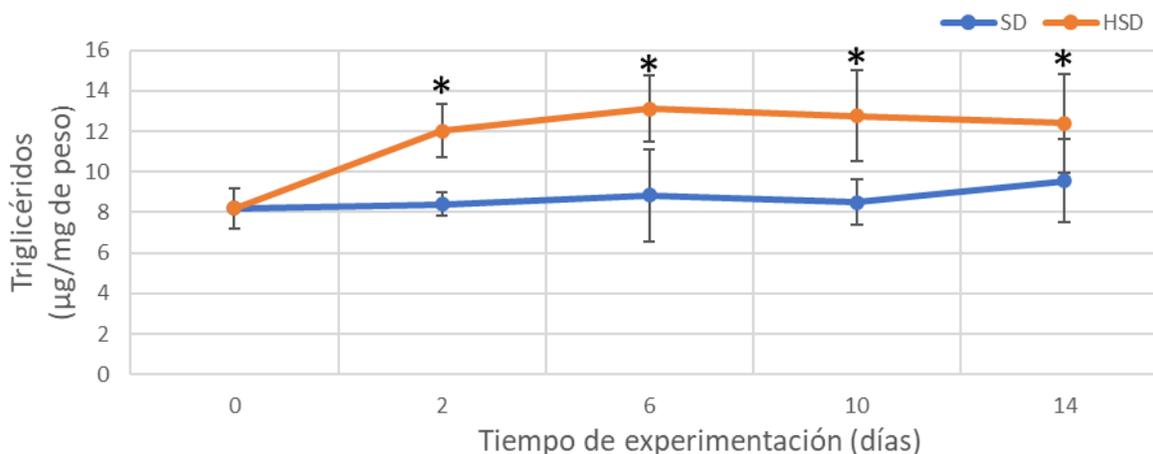


Figura 7. Efecto de la administración de una dieta alta en azúcares durante 14 días en los niveles de triglicéridos totales de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 10 réplicas en grupos de 5 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HSD: dieta alta en azúcares.

6.4 Concentración de glucosa+trehalosa en hemolinfa de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares

La concentración de glucosa+trehalosa en hemolinfa de moscas se estimó para evaluar hiperglucemias desencadenantes en *Drosophila melanogaster* con el tratamiento HSD.

Los resultados muestran un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de glucosa+trehalosa en moscas tratadas con una HSD en comparación con las moscas control SD. A partir del día 2 de iniciado el tratamiento se observó un incremento del 27%.

Este incremento se comportó de manera exponencial, alcanzando su punto máximo en el día 10 de tratamiento, con un incremento del 61% (Figura 8).

Este incremento demuestra que el modelo de *Drosophila melanogaster* HSD presenta fenotipos de hiperglucemia similares a los observados en mamíferos (Gáliková & Klepsatel, 2018).

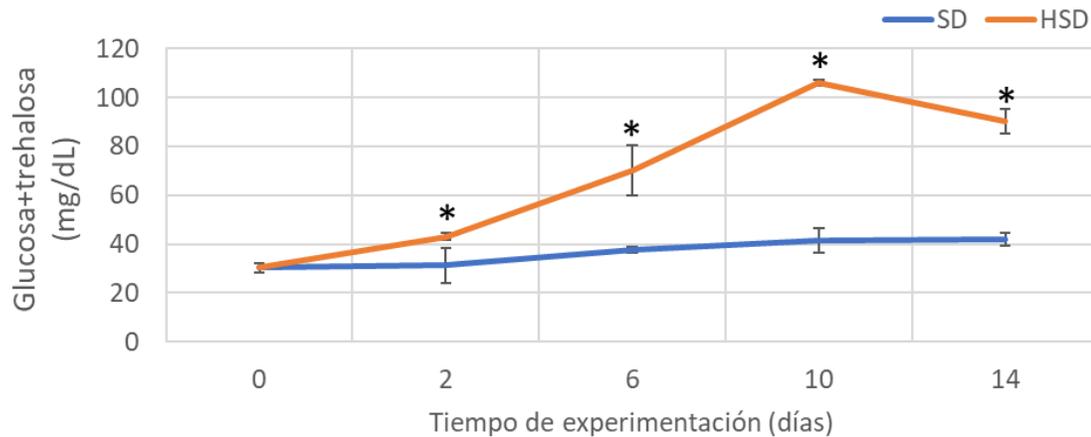


Figura 8. Efecto de la administración de una dieta alta en azúcares durante 14 días en los niveles de glucosa+trehalosa en hemolinfa de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 5 réplicas en grupos de 45 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HSD: dieta alta en azúcares.

6.4 Expresión de *Dilp2* en cabezas de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares

La resistencia a la insulina en humanos es estimada por dos parámetros: la concentración de insulina y glucosa en la sangre. Por ello, después de realizar las determinaciones de glucosa+trehalosa en hemolinfa, se evaluó la expresión del gen *Dilp2* (homólogo de insulina) en *Drosophila melanogaster*, con el objetivo de identificar dicho trastorno en la mosca. Debido a que esta hormona es sintetizada en las IPCs presentes en la región anterior del cerebro medio, se cuantificó la expresión de *Dilp2* por la técnica de RT-PCRq, en cabezas de moscas adultas. La expresión de *Dilp2* se correlaciona directamente con su secreción en hemolinfa, que, a su vez, es dependiente de los niveles de glucosa y trehalosa circulantes.

Los resultados manifestaron un incremento significativo en la expresión de *Dilp2* en el grupo obeso en el día 2 de tratamiento, con un incremento del 27% con respecto al control. Sin embargo, se presenta una disminución en la expresión a partir del día 8, hasta en un 30% en el grupo obeso con respecto al grupo control, en el día 10 de tratamiento. Por otra parte, en el grupo control observamos una tendencia

creciente en la expresión de *Dilp2*, con el paso del tiempo. Esta tendencia se ha identificado en otros estudios donde se ha reportado que *Drosophila melanogaster* en vida silvestre ha desarrollado ciertos grados de resistencia a la insulina (Gáliková & Klepsatel, 2018) (Figura 9).

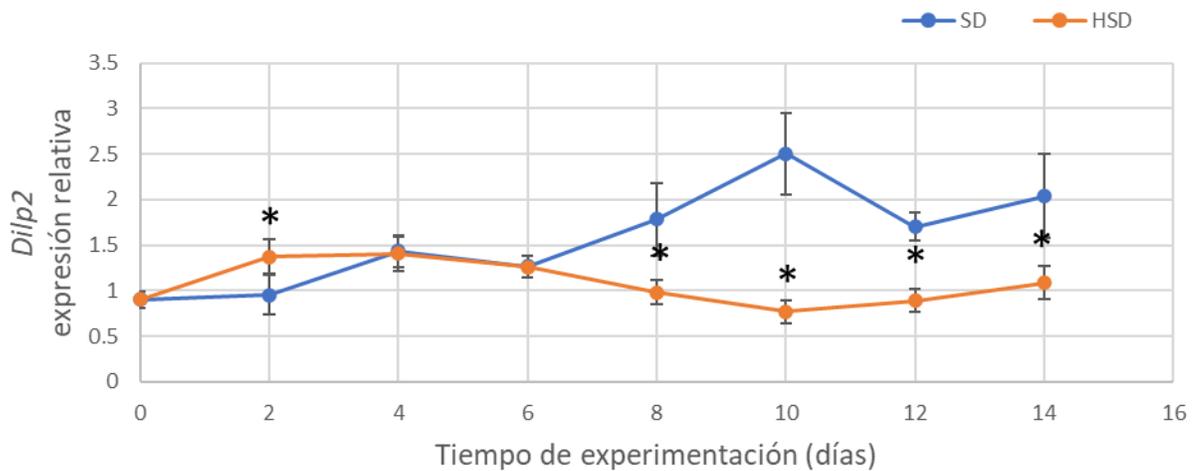


Figura 9. Efecto de la administración de una dieta alta en azúcares durante 14 días en la expresión de *Dilp2* en cabeza de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 5 réplicas en grupos de 45 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HSD: dieta alta en azúcares.

6.5 Análisis lipidómico de moscas tratadas con una dieta alta en azúcares

Una vez caracterizado el modelo de obesidad-resistencia a la insulina en *Drosophila melanogaster* procedimos a realizar un seguimiento del trastorno metabólico por medio de un análisis lipidómico longitudinal dirigido por UPLC-QTOF MSE de las moscas macho adultas tratadas con HSD y SD durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de tratamiento respectivamente. Para el análisis lipidómico dirigido se realizó una búsqueda bibliográfica de referencia para identificar compuestos lipídicos en *Drosophila melanogaster*. Se identificaron 6 clases diferentes de compuestos lipídicos (FA: ácidos grasos; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfatidilglicerol; PS: fosfatidilserina). Con el perfil lipidómico el análisis por UPLC-QTOF MSE resolvieron los metabolitos discriminantes entre los grupos experimentales de

moscas tratadas HSD y SD durante 0, 2, 4, 6, 8 10, 12 y 14 días. Las especies de lípidos se cuantificaron comparando las abundancias de sus precursores con las abundancias de los picos registrados.

Para el análisis multivariado se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y un análisis de componentes principales (PCA) de todo el perfil lipidómico (Figura10), resaltando las principales diferencias entre los grupos experimentales con respecto a la composición de todos los metabolitos identificados. El modelo PCA no supervisado mostró una varianza explicada acumulativa de 83. 2% con los dos primeros componentes, de los cuales el PC1 representó el 74,8% de la varianza explicada. El modelo PLS-DA supervisado mostró una varianza explicada acumulativa del 81,4% con los dos primeros componentes, de los cuales el PC1 representó el 74,8% de la varianza explicada.

Ambos modelos multivariados muestran la distribución de los grupos experimentales principalmente a lo largo del eje X. Curiosamente, el modelo de agrupamiento de k-medias no supervisado (Figura 10 C) identificó tres grupos distintos de los grupos experimentales a lo largo del PC1 (eje X):

El cluster 1 incluyó moscas alimentadas con SD durante 6 días y moscas alimentadas con SD o HSD durante 8, 10, 12 y 14 días (Figura 10 C) que mostraron niveles bajos de lípidos en general, excepto PI 18: 1 18: 1 (Fig. 10 D).

El cluster 2 incluyó moscas en el día 0, moscas alimentadas con SD durante 4 días y moscas alimentadas con HSD durante 6 días (Figura 10 C) que mostraron alto FA18: 2, LysoPE 16: 0, LysoPE 16: 1, LysoPE 18: 1, LysoPI 16: 1, LysoPI 18: 1 y PE 16: 0 16: 1 y bajo LysoPS 16:1 y PI 18:1 18:1 (Figura10 D). El cluster 3 incluyó moscas alimentadas con SD durante 2 días y moscas alimentadas con HSD durante 4 y 6 días (Figura 12C) que mostraron niveles altos de lípidos en general, excepto FA 16: 0, LysoPI 18: 3 y PI 18: 1 18: 1 (Figura 10D).

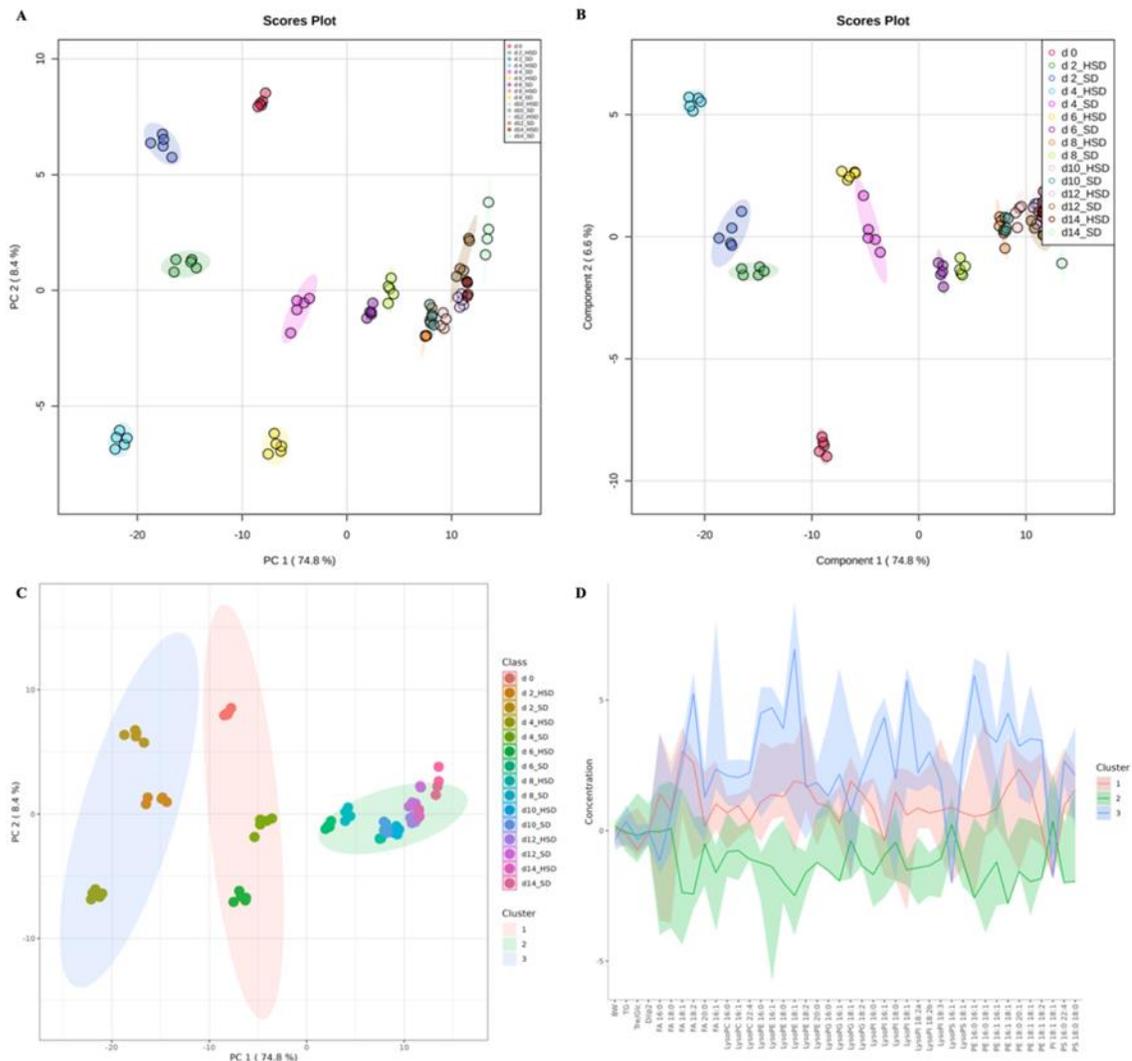


Figura 10. Análisis de Componentes Principales (A), Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (B) y agrupamiento de K-medias (C) y gráfico de descripción general de características de K-medias (D) del perfil lipídico de *D. melanogaster* alimentado con una dieta alta en azúcares por 14 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; PC: componente principal.

Se observaron perfiles lipídicos generales similares en cada grupo que representa un grupo de moscas *Drosophila*; por lo tanto, el análisis lipídico dirigido obtenido en este estudio no permitió la discriminación de una obesidad, resistencia a la insulina, D2M temprana y fenotipo de D2M tardío en moscas alimentadas con HSD.

Posteriormente fueron examinados todos los lípidos en el día 2 (Figura 11), 4 (Figura 12), 6 (Figura13), 8 (Figura 14), 10 (Figura15), 12 (Figura16) y 14 (Figura 17) de sus respectivos tratamientos. Para evaluar el efecto de la dieta HSD destacamos las variables más significativas correspondiente a las diferencias específicas en la abundancia de diferentes clases de lípidos de acuerdo con los valores de la proyección VIP por el análisis PLS-DA entre los grupos experimentales, para cada día de tratamiento (Figura 18). Observamos una clara discriminación entre las moscas de la fruta alimentadas con SD y HSD en cada tiempo experimental (días 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14). En la Tabla 6 se muestra el resultado valorado de todos los metabolitos identificados con significancia estadística ($p < 0,05$) evaluados con un análisis de Fold-change (FC) con respecto a la disminución o aumento del grupo tratado HDS versus el grupo tratado SD ($FC > 0,3$), durante los 14 días de tratamiento. Se encontraron alteraciones significativas ($FC > 1.3$ o $FC < -1.3$, $p < 0.05$) después de dos días de administración de HSD, donde 11 metabolitos fueron incrementados y 11 metabolitos fueron disminuidos. Se identificaron un total de 6 diferentes lípidos que tienen un efecto sobre la dieta HSD que corresponden a 2 clases lipídicas diferentes: 3 tipos de FA (FA 16:0, FA 16:1, FA 18:1) y 3 tipos de fosfatidiletanolamina (LysoPE 16:1, LysoPE 18:1, y PE 16:0/16:1). Se observó una diferencia significativa en la composición de FA, con una tendencia a incrementar en la mayoría de los días de tratamiento HSD versus el tratamiento SD. En FA 16:0 (ácido palmítico) los resultados arrojaron una disminución significativa al día 2 de tratamiento, mientras que en el día 4 y 6 hubo un incremento significativo (1,68-2,17 veces) con el pico máximo de abundancia, los días 8, 10, 12 y 14 también muestran un aumento significativo. Para FA 16:1 se observa un aumento significativo de pico máximo al día 2 de tratamiento, dicho aumento disminuye, pero se mantiene significativo los días 4 y 6 (2,02-3,09 veces) de tratamiento HSD, mientras que los días 8,10 y 12 se normaliza con el grupo control, sin embargo, el día 14 se presentó un aumento significativo. Para FA 18:1 (ácido oleico) se observa un aumento significativo a partir del día 2 con un pico máximo de abundancia al día 6 (3,54-14,07 veces) y una disminución significativa

los días 8 y 10, mientras que los días 12 y 14 los resultados se normalizan con el grupo SD, no obstante, se muestra una disminución en abundancia en el grupo SD a partir del día 10 al 14. Los resultados del grupo de fosfatidiletanolamina (LysoPE) presentan fluctuaciones en los diferentes días de tratamiento del grupo HSD comparado con el SD. En LysoPE 16:1 se observa una disminución significativa al día 2 (-2.37 veces) de tratamiento, mientras que en los días 4, 6, 10, 12 y 14 hay un aumento significativo con un pico máximo de abundancia al día 4 (2.34 veces). En LysoPE 18:1 observamos una tendencia similar, con una disminución al día 2 (-4,34 veces) y un aumento significativo los días 4, 6, 8, 10, 12 y 14 (1,59-8,42 veces) con un pico máximo de abundancia al día 4, pero con una disminución clara del grupo SD los mismos días. Por último, en PE 16:0/16:1 observamos un aumento significativo los días 2, 4 y 6 con un pico máximo de abundancia el día 4, los demás días se observa una normalización con el grupo SD.

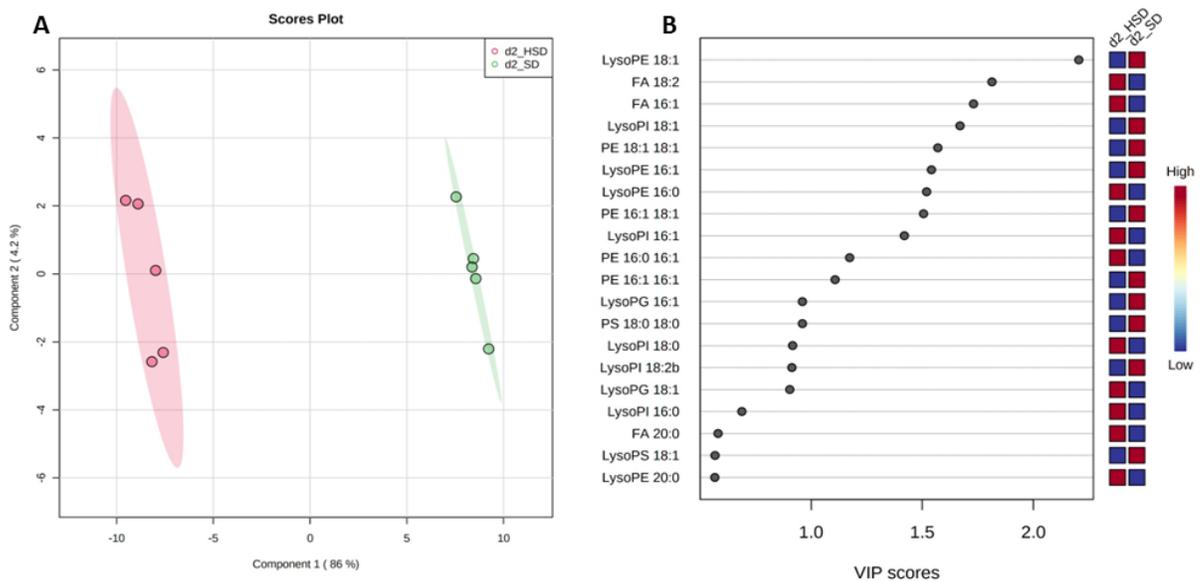


Figura 11. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipidómico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 2 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

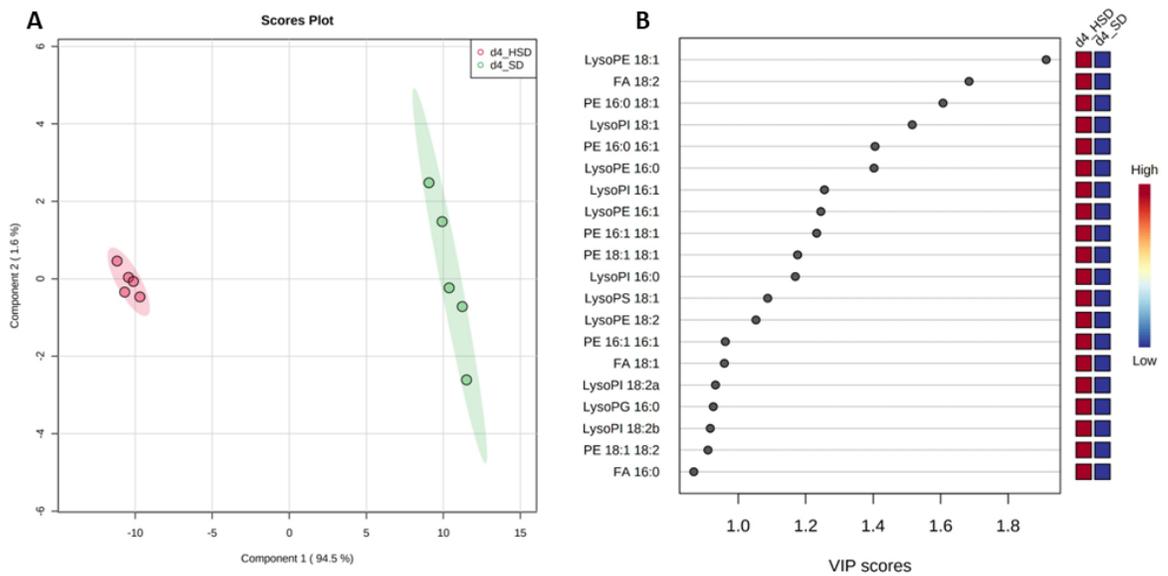


Figura 12. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes en la (B) del perfil lipídico de *D. melanogaster* alimentado con una dieta alta en azúcares por 4 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

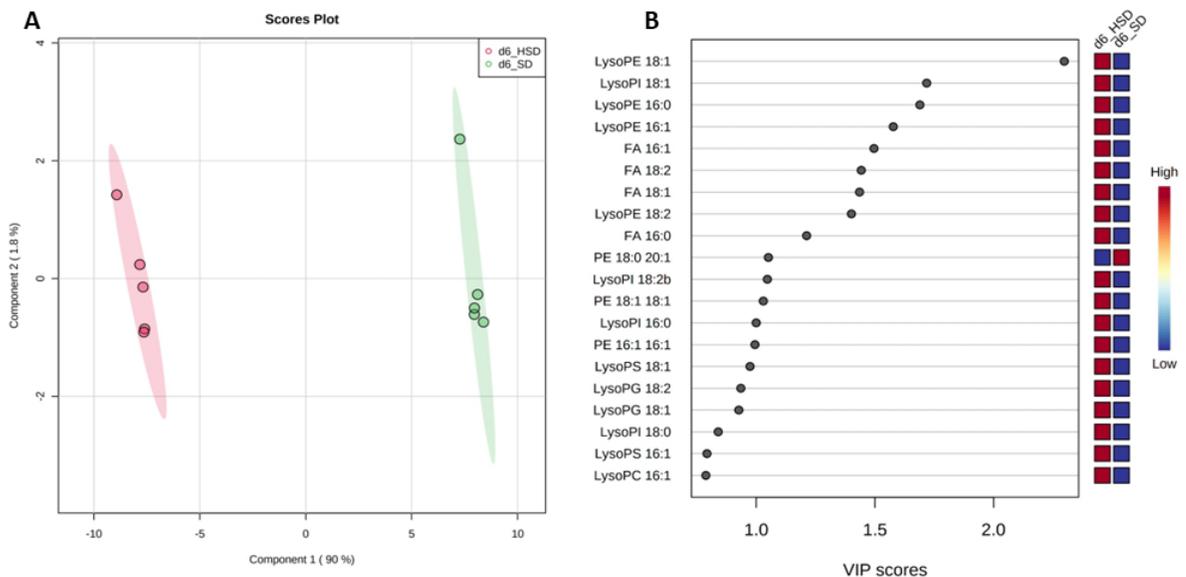


Figura 13. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipídico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 6 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

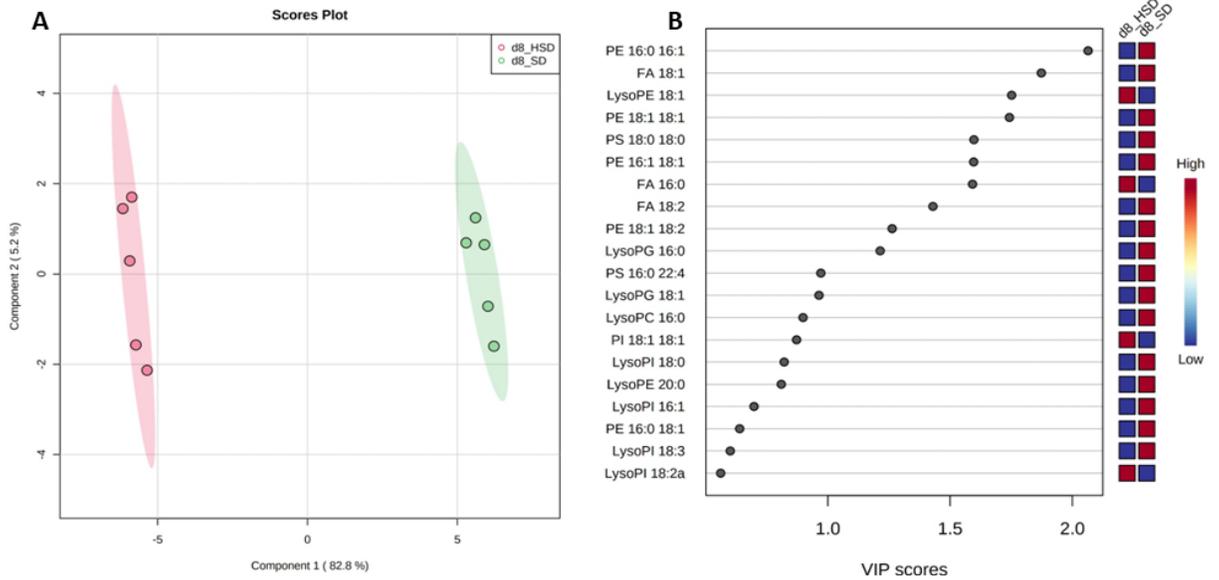


Figura 14. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipídico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 8 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD:fosfatidilserina

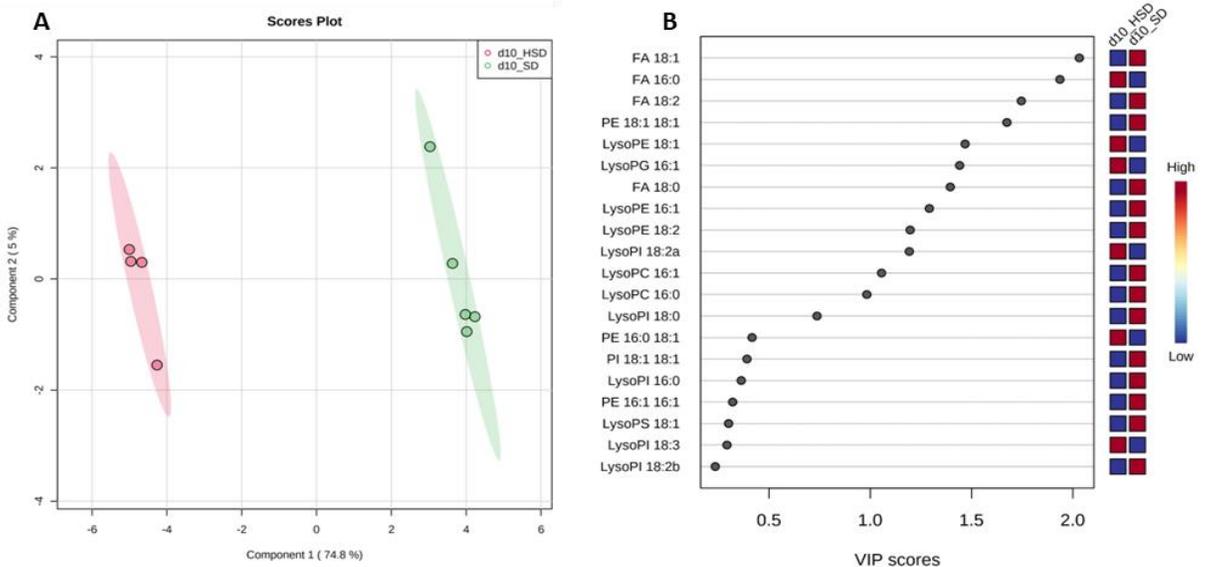


Figura 15. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipídico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 10 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

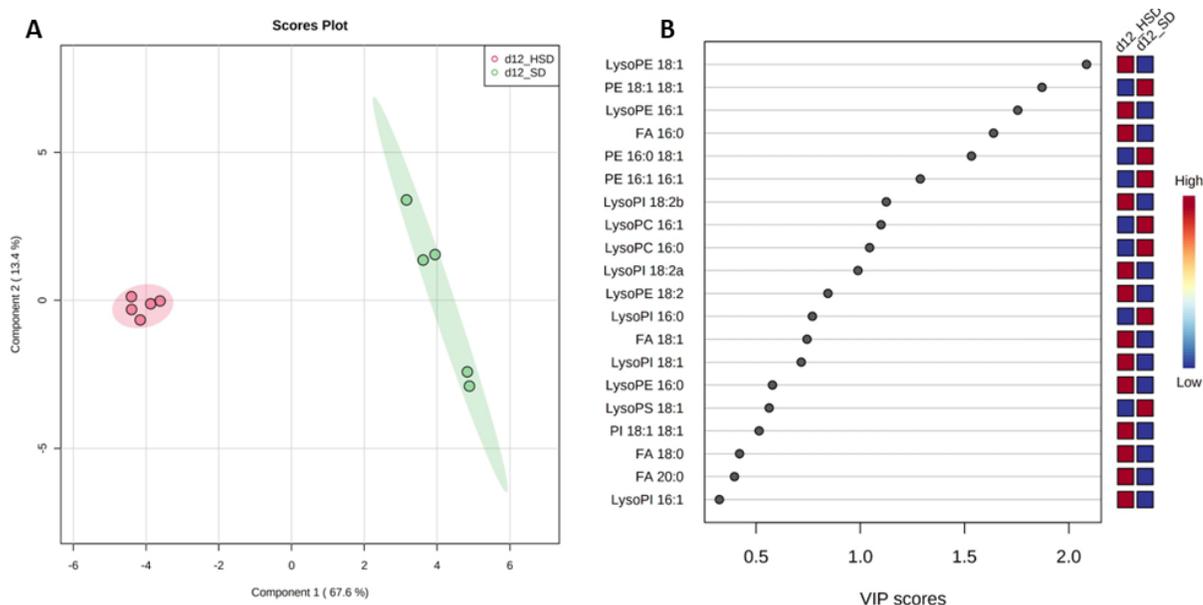


Figura 16. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipidómico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 12 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

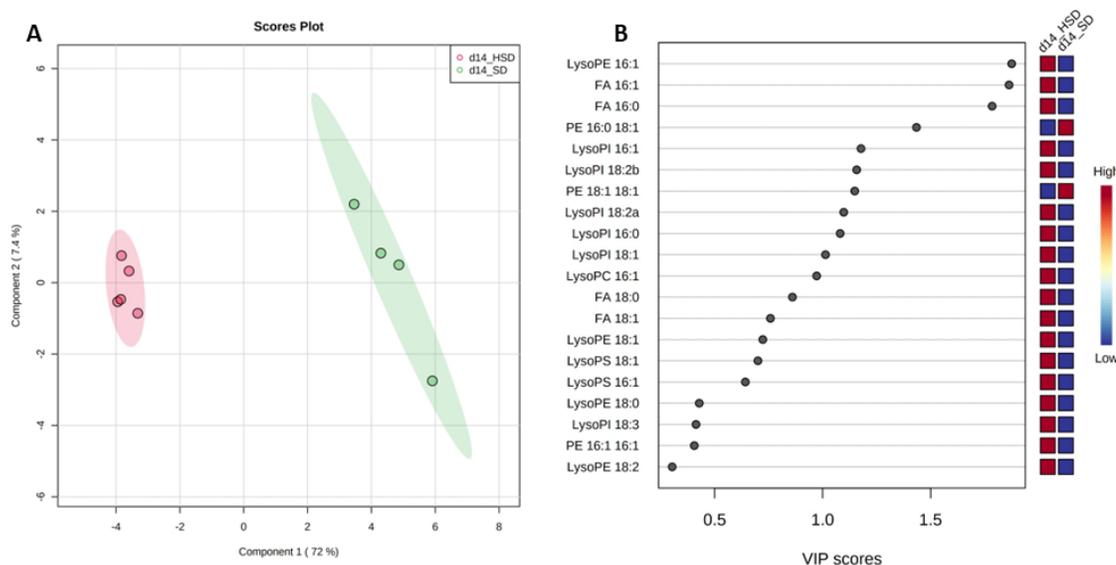


Figura 17. Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (A) y Variables Importantes (B) del perfil lipidómico de *D. melanogaster* alimentadas con una dieta alta en azúcares por 14 días. SD: dieta estándar; HSD: dieta alta en azúcar; FA: ácido graso; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; GPI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicerol; PD: fosfatidilserina.

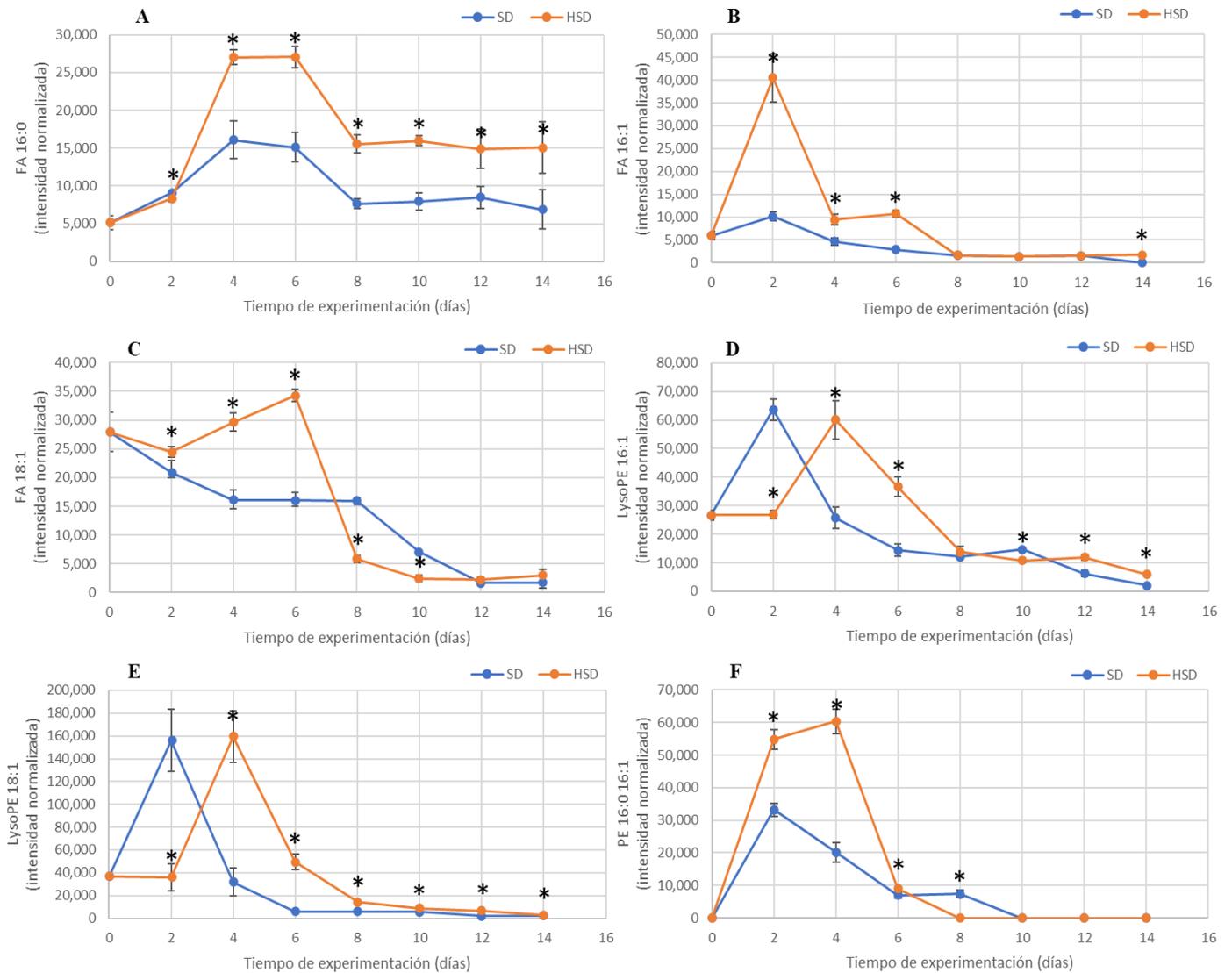


Figure 18. Efecto de la administración de una dieta alta en azúcares durante 14 días los niveles FA 16:0 (A), FA 16:1 (B), FA 18:1 (C), LysoPE 16:1 (D), LysoPE 18:1 (E) y PE 16:0 16:1 (F) de *D. melanogaster*. Los resultados se presentan como la media de 5 réplicas en grupos de 10 moscas, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos representan la significancia estadística por la prueba de Dunnet o Wilcoxon ($p < 0.05$). SD: dieta estándar, HSD: dieta alta en azúcar, FA: ácido graso, PE: fosfatidiletanolamina.

Tabla 6. Perfil lipídómico de *D. melanogaster* alimentado con una dieta alta en azúcares por 14 días.

Compuesto	Día 2		Día 4		Día 6		Día 8		Día 10		Día 12		Día 14	
	Fold-change	Valor de p												
FA 160	-1.09	0.0140*	1.68	<0.0001*	1.79	<0.0001*	2.03	<0.0001*	2.01	<0.0001*	1.75	0.0013*	2.17	<0.0001*
FA 161	3.98	<0.0001*	2.02	<0.0001*	3.77	<0.0001*	1.02	0.5425	1.01	0.9032	1	0.9769	†	-
FA 180	1.17	0.6981	1.84	0.2733	2.14	0.0279*	-2.73	0.1914	-2.87	0.0133	1.35	0.5039	1.53	0.1375
FA 181	6.82	0.0077*	14.07	<0.0001*	3.54	<0.0001*	-4.68	<0.0001*	-4.04	<0.0001*	-1.36	0.1476	-1.02	0.0614
FA 182	2.1	<0.0001*	1.71	<0.0001*	2.64	<0.0001*	-1.62	0.0017*	-1.08	<0.0001*	1.21	0.446	-1.02	0.9083
FA 200	3.98	0.0009*	2.02	0.0048*	3.77	<0.0001*	1.02	0.0063*	1.01	0.6308	-1	0.0473	-1.02	0.9286
LysoPC 160	1.34	<0.0001*	5.86	<0.0001*	2.67	<0.0001*	-4.15	0.3919	†	-	†	-	nd	-
LysoPC 161	1.68	<0.0001*	7.42	<0.0001*	5.05	<0.0001*	-2.01	0.0233*	†	-	†	-	†	-
LysoPC 224	-1.13	0.2029	3.18	<0.0001*	1.2	0.1172	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
LysoPE 160	5.07	<0.0001*	8.1	<0.0001*	10.09	<0.0001*	1.05	0.3919	1.03	0.1457	1.42	0.0333*	-1.07	0.6591
LysoPE 161	-2.37	<0.0001*	2.34	<0.0001*	2.55	<0.0001*	1.14	0.1138	1.35	<0.0001*	1.91	<0.0001*	2.95	<0.0001*
LysoPE 180	-1.29	0.1284	2.39	0.0017*	1.66	0.0047*	1.3	0.0219*	-1.02	0.0855	1.04	0.674	1.33	0.0139*
LysoPE 181	-4.34	<0.0001*	5	<0.0001*	8.42	<0.0001*	2.47	<0.0001*	1.59	<0.0001*	3.11	<0.0001*	1.61	<0.0001*
LysoPE 182	-1.05	0.8005	3.22	<0.0001*	6.03	<0.0001*	1.08	0.4775	-1.97	<0.0001*	1.6	0.0117*	1.1	0.1154
LysoPE 200	2.38	<0.0001*	5.1	<0.0001*	2.94	0.0023*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-
LysoPG 160	1.49	0.0002*	5.18	<0.0001*	1.38	<0.0001*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-
LysoPG 161	-3.54	0.0094*	2.69	<0.0001*	-1.49	0.0050*	-1.08	0.3982	†	-	nd	-	nd	-
LysoPG 181	†	-	2.72		2.79		-2.39		-1.04		nd	-	nd	-
LysoPG 182	-1.66	0.0077*	1.5	<0.0001*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
LysoPI 160	1.58	<0.0001*	8.44	<0.0001*	3.04	<0.0001*	1.33	0.0009*	-1.21	0.0862	-1.84	<0.0001*	†	-
LysoPI 161	3.44	<0.0001*	4.18	<0.0001*	-1.23	0.0351*	-1.25	<0.0001*	1.01	0.8055	1.07	0.1707	1.81	0.0076*
LysoPI 180	†	-	2.5	<0.0001*	2.99	<0.0001*	-2.34	<0.0001*	-1.69	0.0011*	1.12	0.2906	nd	-
LysoPI 181	-4.8	<0.0001*	7.85	<0.0001*	12.98	<0.0001*	1.17	0.0832	1.04	0.1077	1.38	0.0017*	1.92	<0.0001*
LysoPI 182a	-1.21	0.066	2.68	<0.0001*	1.66	0.0004*	1.32	0.0062*	1.99	<0.0001*	1.94	0.0006*	2.49	<0.0001*
LysoPI 182b	-1.93	0.066	3.02	<0.0001*	3.24	0.0004*	-1.12	0.0062*	-1.07	<0.0001*	2.1	0.0006*	2.28	<0.0001*
LysoPI 183	-1.05	0.2874	1.83	<0.0001*	1.52	<0.0001*	-1.39	0.0039*	1.12	0.575	1.02	0.7771	1.17	0.0769
LysoPS 161	nd	-	1.9	0.0022*	2.89	<0.0001*	-1.07	0.5754	1.05	0.7626	-1.08	0.6021	1.72	0.0018*
LysoPS 181	-1.46	0.0003*	8.38	<0.0001*	4.5	<0.0001*	1.12	0.0717	-1.13	0.1614	-1.44	0.0214*	1.76	<0.0001*
PE 160 161	1.65	<0.0001*	3	<0.0001*	1.3	0.0015*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-
PE 160 181	-1.27	0.1723	6.7	<0.0001*	1.28	0.0323*	-1.42	0.0559	1.15	0.2335	-2.9	<0.0001*	-4.63	<0.0001*
PE 161 161	-3.14	<0.0001*	3.37	<0.0001*	2.68	0.0126*	1.25	0.1416	-1.12	0.234	-2.82	<0.0001*	1.23	0.1672
PE 161 181	-2.4	<0.0001*	3.03	<0.0001*	1.15	0.0728	†	-	nd	-	nd	-	nd	-
PE 180 201	-1.05	0.3913	-1.67	0.0002*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
PE 181 181	-4.33	<0.0001*	4.2	<0.0001*	2.07	<0.0001*	-5.95	<0.0001*	-3.62	<0.0001*	-5.86	<0.0001*	-2.28	<0.0001*
PE 181 182	-1.11	0.0048*	4.34	<0.0001*	1.18	0.0024*	†	-	nd	-	nd	-	nd	-
PI 181 181	nd	-	†	-	-1.03	0.6707	2.48	<0.0001*	-1.22	0.0511	1.44	0.0279*	-1.15	0.5952
PS 160 224	-1.45	<0.0001*	3.21	<0.0001*	1.78	<0.0001*	-3.17	5952	nd	-	nd	-	nd	-
PS 180 180	-2.27	<0.0001*	-1.42	0.0497*	-1.02	0.8594	†	-	nd	-	nd	-	nd	-

Análisis de Fold-change (FC), los asteriscos representan la significancia estadística ($p < 0.05$), con respecto a la disminución o aumento del grupo tratado HDS versus el grupo tratado SD ($FC > 1.3$ o $FC < -1.3$, $p < 0.05$).

7 Discusión

La obesidad en *Drosophila melanogaster* ha sido un tema de discusión científica por años. No existen parámetros establecidos que logren distinguir con precisión el término de obesidad en la mosca, sin embargo, actualmente se ha clarificado este concepto, y se ha establecido que en el modelo de *Drosophila melanogaster* el estado de obesidad es estimado de acuerdo con los niveles de triglicéridos totales, siendo que esta determinación refleja el contenido total de grasa en la mosca. Un incremento en la concentración de triglicéridos se refleja en cambios en el almacenamiento de grasa, promoviendo un aumento en el volumen de gotas lipídicas, fenotipo similar a la obesidad en mamíferos reconocido como hipertrofia adipocitaria (Musselman & Kühnlein, 2018).

7.1 Efecto de una dieta alta en grasa sobre la inducción de obesidad en *D. melanogaster*

Una dieta hipercalórica puede promover la obesidad en la mosca, es por esta razón que en el presente proyecto se evaluaron diferentes dietas obesogénicas para estimular un estado de obesidad crónica en la mosca. Dietas ricas en grasas han sido reportadas por algunos investigadores como inductoras de obesidad en la mosca (Hong *et al.*, 2016, Musselman *et al.*, 2018); sin embargo, el tratamiento HFD utilizado en este trabajo, el cual fue adicionado con aceite de coco al 15%, no indujo un estado de obesidad crónica en las moscas

En el tratamiento HFP observamos una fluctuación y disminución en la concentración de triglicéridos específicamente a partir del día 6. Esta condición no solo se presentó en el grupo enfermo, sino que también en el grupo control, lo que podría indicar que a partir del día 6 las condiciones de incubación de las moscas para ambas dietas fueron alteradas, posiblemente debido a la desecación de los

medios de comida. Por esta razón se tomó la decisión de cambiar a las moscas a medios de comida nueva, cada 6 días.

Para este estudio se utilizó aceite de coco grado alimentario de uso comercial; sin embargo, a pesar de ser un tratamiento empleado para estimular obesidad en *D. melanogaster*, no es una técnica completamente estandarizada y no se ha reportado la composición de los aceites de coco utilizados por otros autores, por lo que la diferencia en la composición de este ingrediente pudiera afectar la inducción de obesidad.

Por otra parte, estos resultados podrían indicar que las moscas no comieron lo suficiente, debido a que las condiciones de la dieta posiblemente no son de su preferencia. Si este fuera el caso, las moscas consumieron cantidades mínimas de alimento, las suficientes solo para mantener su homeostasis energética. Al igual que otros animales, la mosca tiene preferencias alimentarias basadas en el sabor; por esta razón, tanto el sistema sensorial como la conducta alimentaria que las moscas desarrollen podrá ser alterada en base a la composición de la dieta (Itskov, & Ribeiro, 2013). Se ha demostrado que algunas dietas desencadenan señales de saciedad más rápidas que otras dietas (Reis, 2016).

7.2 Efecto de una dieta alta en azúcares sobre la inducción de obesidad en *D. melanogaster*

En la mosca de la fruta, una dieta con sustratos ricos en azúcares simboliza una fuente natural de alimento, es por esta razón que una dieta rica en azúcar (HSD) representa una dieta preferente para las moscas a comparación de una dieta HFD. Una dieta HSD se refiere típicamente a una adición del 30% de azúcar agregando sacarosa, fructosa o glucosa al medio de comida estándar (Gáliková & Klepsatel, 2018). En algunos estudios se ha comparado la dieta HFD con HSD, y se ha demostrado que una dieta rica en carbohidratos produce un incremento en la ingesta dietética mayor que una dieta HFD, y esto se ve reflejado en el aumento de almacenamiento de energía dietética. Se sugieren que este comportamiento

alimenticio contribuye a alteraciones metabólicas que las dietas pueden desencadenar (Reis, 2016).

El tratamiento HSD que se empleó en este proyecto (fructosa al 30%), fue suficiente para inducir obesidad crónica en la mosca. Donde apreciamos en el grupo HSD un incremento significativo en la concentración de triglicéridos totales a partir del día 2 de inicio del tratamiento hasta el día 14. Estos resultados no solo sugieren un incremento en el contenido total de grasa, sino que también la inducción de cambios en la forma de almacenamiento de energía en el cuerpo graso de la mosca.

Drosophila melanogaster almacena el exceso energético en forma de glucógeno y lípidos en el cuerpo graso, y al igual que en mamíferos, su tamaño y número de células varían dependiendo de la carga lipídica que contengan. Se ha demostrado que un aumento en la concentración total de triglicéridos es directamente proporcional al incremento en el tamaño de gotas lipídicas en el cuerpo graso de la mosca, fenotipo que también se observa en la hipertrofia adipocitaria en mamíferos (Musselman, *et al.*, 2011).

En la mosca, el término de obesidad no se define con parámetros establecidos como es el caso del IMC en mamíferos, no obstante, es un término que se usa como equivalente para un mayor almacenamiento de grasa que se expresan como valores brutos absolutos normalizados al peso corporal (Musselman & Kühnlein, 2018). Por lo tanto, podríamos concluir que el incremento observado en la concentración de triglicéridos totales en las moscas con el tratamiento HSD manifiesta un fenotipo de obesidad. Dicha tendencia creciente se mantiene constante durante todos los días de tratamiento, lo que refleja una patología crónica de obesidad que fue constante durante los 14 días de tratamiento obesogénico, comparado con el grupo control.

Por otra parte, al comparar el peso corporal de las moscas en tratamiento, observamos que dicho modelo de obesidad no se vio reflejado en cambios en el peso. Algunos estudios han comprobado que los cambios fenotípicos en las moscas con obesidad pueden verse reflejados macroscópicamente como aumento

en el área abdominal e incluso en el peso corporal de la mosca (Musselman, *et al.*, 2011). Sin embargo, estos cambios se presentan cuando las condiciones dietéticas se modifican desde la etapa larvaria, momento en que la larva sufre cambios a nivel estructural que le permite incrementar su tamaño en varias etapas de desarrollo. En el ciclo de vida de las moscas, las larvas de los primeros dos estadios comen continuamente, modificando su estructura y mudando de exoesqueleto en cada etapa. Dicho proceso es regulado por la secreción de ciertas hormonas como la “hormona juvenil” (JH) y la ecdisona. La vía de la insulina regula el crecimiento larvario durante estas etapas del desarrollo, adecuando el crecimiento al incremento en la ingesta alimenticia de la larva o incluso al tipo de tratamiento hipercalórico.

Se ha demostrado que las larvas alimentadas con dietas ricas en azúcares muestran afectaciones en su tamaño, así como un retraso en su desarrollo semejante al comportamiento observado en moscas con una vía de señalización de la insulina alterada (Musselman, *et al.*, 2011). No obstante, en la etapa adulta la mosca ya no crece ni tiene mudas, por lo tanto, el fenotipo de obesidad suele no verse reflejado en cambios en el peso corporal (Otero-Moreno *et al.*, 2016).

7.3 Efecto de una dieta alta en azúcares sobre la inducción de resistencia a la insulina en *D. melanogaster*

El cuerpo graso de *D. melanogaster* representa el centro metabólico de la mosca ya que no solamente funge como un depósito de grasa, también, al igual que en mamíferos, ejerce la función de un órgano endocrino e inmunológico (Droujinine & Perrimon, 2016), capaz de regular la secreción de hormonas, así como la señalización de *Dilp2*, fundamentado en las señales dietéticas de la mosca. Una sobrealimentación promovida por la dieta HSD produce un exceso en la acumulación de grasa en la mosca y cambios en el almacenamiento del cuerpo graso, lo que promueve una alteración en la homeostasis metabólica. Dicho modelo de obesidad en *D. melanogaster* manifiesta alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina que genera un incremento en la expresión de *Dilp2* así

como un deterioro en la activación del receptor InR (Musselman, *et al.*, 2011). También se ha visto asociado con la reducción del tiempo de vida útil y la mortalidad de la mosca (Galenza, *et al.*, 2016).

Tras un tratamiento HSD en moscas macho adultas, promovimos un incremento en la concentración total de triglicéridos, acompañado de trastornos hiperglucémicos. En este modelo de obesidad inducido por HSD, identificamos un incremento en la expresión de *Dilp2* al día 2 de inicio del tratamiento, reconocido como una hiperinsulinemia en la etapa temprana del tratamiento HSD, acompañado de una hiperglucemia. Este efecto se interpreta como una compensación inicial tras el estado hiperglucémico fomentado por el tratamiento HSD resultando entonces en un incremento en la expresión de *Dilp2*.

En cambio, en la etapa tardía de tratamiento HSD (de 8 a 14 días) los resultados mostraron una disminución en la expresión de *Dilp2*, definido como hipoinsulinemia en *Drosophila melanogaster*, que se mantuvo acompañado del mismo trastorno hiperglucémico que en la etapa inicial, pero que curiosamente coincide con el incremento más alto de glucosa+trehalosa en todo el experimento. La disminución en la expresión de *Dilps* en etapas tardías del trastorno obeso acompañado de una hiperglucemia crónica, se ha atribuido como una deficiencia en las células productoras de insulina (IPC) en la mosca, debido a que la activación de IPC puede ser modulada por señales nutricionales en circulación, este efecto podría ser consecuencia de una sobrecarga en su función compensatoria (Nässel, *et al.*, 2013). Podríamos aludir este deterioro como una disfunción semejante a la presentada en las células beta pancreáticas de mamíferos durante trastornos como resistencia a la insulina y DM2 (Musselman & Kühnlein, 2018).

Se ha demostrado que un tratamiento obesogénico prolongado en *D. melanogaster* puede estimular a la baja la fosforilación de AKT, acompañado a la par de trastornos hiperglucémicos y obesidad. Al igual que en mamíferos, AKT regula la señalización río abajo de los *Dilps*, por lo tanto, una disminución en su fosforilación (activación)

es considerada un marcador claro del efecto reducido en la señalización, expresión o secreción de la insulina (Hong & Yu, 2016).

7.4 Efecto de una dieta alta en azúcares sobre la inducción de DM2 en *D. melanogaster*

El modelo de obesidad en *Drosophila melanogaster* establecido en este proyecto, tras el tratamiento HSD, parece presentar un comportamiento similar al fenotipo de resistencia a la insulina, teoría que se respalda en la hipertrigliceridemia, hiperglucemia e hiperinsulinemia, presentada en el día 2 de tratamiento HSD. Mediante el seguimiento cronológico de estas patologías se pueden precisar la continuación del desarrollo consecuente de un fenotipo similar a la DM2 en la mosca, con una etapa temprana entre los días 4 a 6 y finalmente una etapa tardía de la enfermedad en la temporalidad 8 a 14 días, donde se aprecia una hipertrigliceridemia, hiperglucemia, así como, una hipoinsulinemia.

Este carácter hiperglucémico con evidentes alteraciones en la homeostasis de insulina/glucosa, en las moscas alimentadas HSD, ha sido evaluada por diversos estudios que respaldan su efecto de carácter análogo a la DM2 en mamíferos (Musselman & Kühnlein, 2018).

La DM2 en la mosca se ha evaluado por alteraciones patologías estructurales generadas por las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta, promoviendo una serie de patologías asociadas a la DM2 como miocardiopatías. Este efecto se observó en un estudio por Birse et al. (2010), a partir de una dieta HSD que produjo alteraciones en los patrones de contractibilidad cardiaca asociado a una sobre activación de la vía TOR por la acumulación de grasa ectópica en las moscas, asemejando a la miocardiopatía diabética en mamíferos.

Por otra parte, se ha demostrado que moscas tratadas con una dieta HFD presentan un daño a nivel de los nefrocitos pericárdicos, células encargadas de

filtrar la hemolinfa, fenotipo que se interpreta como una condición semejante a la nefropatía diabética (Na, J., et al., 2015).

Estos efectos patológicos en la mosca se han atribuido en parte a una sobre activación de JNK en respuesta al estrés hipercalórico inducido por la dieta que como consecuencia promueven la sobre expresión de apolipoproteína D (ApoD) implicada en la resistencia a la insulina y DM2 (Pasco, & Léopoldo, 2012).

Por otro lado, la activación de una respuesta inflamatoria como resultado del tratamiento con una dieta HFD y los consecuentes trastornos metabólicos, induce la sobre activación de células inmunes y la secreción de ciertas citocinas, especialmente Upd3 la cuál ha sido implicada en un proceso inflamatorio crónico asociado a la resistencia a la insulina en la mosca (Woodcock, et al., 2015). No obstante, se requiere hacer más estudios que permitan definir los procesos desencadenantes en estos trastornos asociados a la DM2.

7.5 Efecto de una dieta alta en azúcares sobre el perfil lipídico de *D. melanogaster* asociado a la transición obesidad-resistencia a la insulina-DM2

El análisis metabolómico en los últimos años ha demostrado ser una herramienta prometedora para la comprensión de trastornos metabólicos asociados a enfermedades como obesidad, resistencia a la insulina y DM2, brindando un panorama completo de los metabolitos implicados en dichos trastornos que permiten definir los mecanismos de patogenicidad que la subyacen (Mamas et. al., 2011). Ya que actualmente se reconoce que tanto el perfil lipídico como la masa corporal son los principales predictores de trastornos metabólicos (Park, et al., 2015). En este estudio se realizó la identificación y cuantificación de un perfil lipídico en *Drosophila melanogaster*, comparando dos condiciones de tratamiento: las moscas del grupo obeso alimentadas con HSD versus las moscas del grupo control alimentadas con SD.

Para poder explicar la posible relación metabólica asociada a estas enfermedades se realizó un seguimiento metabolómico durante los 14 días de tratamiento

obesogénico, donde se demostró el fenotipo de obesidad crónica acompañado de trastornos hiperglucémicos con resistencia a la insulina en la mosca. Este análisis lipidómico demostró cambios sobre el perfil lipídico en moscas con un tratamiento de HSD, en particular identificamos el metabolismo alterado de 6 tipos de lípidos: 3 tipos de ácidos grasos (FA 16:0, FA 16:1, FA 18:1) y 3 tipos de fosfatidiletanolamina (LysoPE 16:1, LysoPE 18:1, y PE 16:0/16:1).

Algunos estudios (Gogna *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2014) han reconocido que, en un estado de obesidad en mamíferos, los niveles de ácidos grasos no esenciales tienden a aumentar, por ejemplo, el ácido oleico (FA 18:1), ácido palmítico (16:0) y ácido palmitoleico (16:1) se encuentran aumentados en la obesidad, situación que se correlaciona con el análisis lipídico en los días 4 y 6 de los tratamientos obesogénico HSD.

Recientes estudios (Korbecki y Bajdak-Rusinek, 2019; Li *et al.*, 2021) han demostrado la implicación del ácido palmítico en la resistencia a la insulina, asociado a la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y lipotoxicidad. Se probó que los productos metabólicos del ácido palmítico como algunos fosfolípidos derivados de C 16, diacilglicerol y ceramidas producen lipotoxicidad a nivel de tejido adiposo desencadenando la acumulación de ROS y promoviendo el estrés oxidativo y daño a nivel mitocondrial. Estos eventos promueven la activación de la vía de señalización de TLR4/NF- κ B, que a su vez impulsa la fosforilación inhibitoria del sustrato del receptor de insulina (IRS) alterando toda la cascada de señalización río abajo y promoviendo la resistencia a la insulina.

Estos resultados sugieren que dichos metabolitos lipídicos pueden ser posibles indicadores del progreso de obesidad a resistencia a la insulina según el seguimiento del presente modelo experimental, específicamente en los días 4 y 6 de tratamiento obesogénico, donde se puede observar que la etapa temprana del trastorno hiperglucémico y resistente a la insulina. Curiosamente identificamos LysoPE 16:1 y LysoPE 18:1 incrementados en la misma temporalidad vinculado también al progreso de obesidad resistencia a la insulina. Estas observaciones

resultan congruentes con un estudio realizado por, Wang et al. (2015) donde identificaron a LysoPE 18:1 como un metabolito discriminante entre pacientes con obesidad, hiperlipidemia y resistencia a la insulina.

Por su parte los LysoPEs han desarrollado un potencial interés como candidatos a biomarcadores en pacientes con obesidad para señalar su posible implicación metabólica en la resistencia a la insulina. Algunos LysoPE, especialmente 16: 0, 18: 1 y 18: 2 han presentado concentraciones incrementadas con una significancia estadística en pacientes adultos con obesidad y alteraciones metabólicas con rasgos aterogénicos (Kim *et al.*, 2020). Acompañada de una mayor actividad circulante de fosfolipasa A₂, una enzima que hidroliza PE en LysoPE, asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂) y niveles más altos de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL) y 8-epi-prostaglandina F_{2α} urinaria (8-epi-PGF_{2α}), que se refleja con efectos del estrés oxidativo y daño tisular vinculado a los lípidos.

Además, otros estudios han demostrado la implicación patológica de LysoPE en el desarrollo de la enfermedad de hígado graso o esteatohepatitis no alcohólica asociada con la resistencia a la insulina. Consecuencia del papel implicado específicamente de LysoPE 18:2 exógeno que promueve la formación de gotas lipídicas celulares y genera la acumulación de triglicéridos (Yakamoto *et al.*, 2022).

Por otra parte, en un estudio donde evalúan el perfil lipídico de *Drosophila melanogaster* asociado a cambios en la dieta (Carvalho *et al.*, 2012), se demostró que una dieta a base de levadura con una cantidad rica en lípidos puede aumentar las concentraciones de ciertas especies lipídicas como PE en la mosca. Dicho estudio demostró la expresión diferencial de los lípidos en diferentes órganos en la mosca, demostrando que, si bien el cuerpo graso en *Drosophila melanogaster* es el principal órgano almacenador de lípidos y posee cantidades mayores a las de otros tejidos, se atribuyó que algunas especies de PE que incrementan en la dieta rica en lípidos se destacan como fuente principal de lipoproteínas en circulación. Es decir que tienden a generar un incremento dependiente de la dieta obesogénica ubicado a nivel de circulación como fuente principal de lipoproteínas en mosca. En

el presente estudio el metabolito PE 16:0/16:1 presenta un incremento en los primeros días de tratamiento HSD (2, 4 y 6 días) y posteriormente sufre una disminución normalizada con el grupo SD, este efecto empata con el inicio del declive en expresión de *Dilp2*, que podría explicar el efecto a largo plazo de la obesidad e hiperglucemia concluida en una resistencia a la insulina asociada al declive en la función de las células beta pancreáticas.

No obstante, en la actualidad existe un obstáculo en la lipidómica como ciencia ómica relativamente reciente, debido a la poca información existente y estudios aplicados que limitan la interpretación y discusión de las implicaciones metabólicas del perfil lipidómico alterado en la aparición y desarrollo de enfermedades crónicas como la DM2. Por esta razón se requiere realizar más estudios que nos permitan comprender la relación causal entre la FA y la EP que contienen 16 y 18 átomos de carbono saturados y monoinsaturados y la aparición y progresión de la obesidad, la resistencia a la insulina y la DM2.

8 Conclusión

Los resultados obtenidos demostraron un claro deterioro metabólico progresivo a lo largo del tiempo, donde inferimos el comportamiento similar a la resistencia a la insulina en una etapa temprana del tratamiento obesogénico (día 2), respaldado en la hipertrigliceridemia, hiperglucemia e hiperinsulinemia, dicho trastorno evoluciona a lo largo del tiempo y concluye con un fenotipo similar a la DM2 en la etapa temprana y tardía de la enfermedad, apreciada entre los días 8 a 14 con hipertrigliceridemia, hiperglucemia e hipoinsulinemia. Dichas alteraciones metabólicas fueron caracterizadas por alteraciones en ácidos grasos y lisofosfatidiletanolaminas de 16 y 18 carbonos, marcando la temporalidad cronológica de cada etapa en la transición obesidad resistencia a la insulina. El aporte de estos resultados podría estar implicado en la explicación fisiopatológica de la relación metabólica entre obesidad, resistencia a la insulina y DM2, siendo que estos metabolitos podrían fungir como indicadores del riesgo o predisposición a desarrollar resistencia a la insulina y DM2. No obstante se requiere hacer más estudios que respalden estos resultados y expliquen el mecanismo patogénico de estas enfermedades, con una posible área de interés para investigaciones futuras en la búsqueda de dianas terapéuticas y diagnósticos oportunos en la enfermedad.

9 Referencias

- Alegre Díaz, J. Herrington, W. López-Cervantes, M. Gnatiuc, L. Ramirez, R. Hill, M. Emberson. (2016). Diabetes and cause-specific mortality in Mexico City. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605368>.
- Aleman, L. & Guerrero, J. (2018). Hiperglicemia por sepsis: del mecanismo a la clínica. *Rev. Med. Chil*. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000400502>.
- American Diabetes Association. (2019). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- American Diabetes Association. (2019 b). Standards of medical care in diabetes, Abridged for Primary Care Providers. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- Arneth B, Arneth R, Shams M. (2019). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. May 18;20(10):2467. <https://doi.10.3390/ijms20102467>.
- Arredondo, A., & De Icaza, E. (2011). Costos de la diabetes en América Latina: evidencias del caso mexicano. *Value in Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2011.05.022>
- Bello-Chavolla, O. Y., Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C. A., & Hernández-Avila, M. (2017). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutrition Reviews*. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>
- Benomar, Y. & Taouis, M. (2019). Molecular mechanisms underlying obesity-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance: pivotal role of resistin/tlr4 pathways. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00140>.
- Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., Ocorr, K., Bodmer, R., & Oldham, S. (2010). High-fat-diet-induced obesity and heart

- dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.014>
- Boyd, J.C. and D.E. Bruns. (2001). Quality specifications for glucose meters: assessment by simulation modeling of errors in insulin dose. *Clin Chem*. <https://doi.org/209-14>.
- Carvalho, M., Sampaio, JL, Palm, W., Brankatschk, M., Eaton, S. y Shevchenko, A. (2012). Efectos de la dieta y el desarrollo en el lipidoma de *Drosophila*. *Biología de sistemas moleculares*, 8, 600. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.29>
- Chatterjee N, Perrimon N. (2021). What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. *Sci Adv*:.eabg4336. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg4336>.
- Cirulli ET, Guo L, Leon Swisher C, Shah N, Huang L, Napier LA, Kirkness EF, Spector TD, Caskey CT, Thorens B, Venter JC, Telenti A. (2019). Profound Perturbation of the Metabolome in Obesity Is Associated with Health Risk. *Cell Metab*. <https://doi.org/10.1016/j>.
- Classification and Diagnosis of Diabetes. (2019). Standards of medical care in diabetes *Diabetes Care*, 42. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature Medicine*, 23(7), 804-814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
- Deyannira Otero Moreno María, Teresa Peña-Rangel, Juan Rafael Riesgo Escovar (2016). Growth and Metabolism: Regulation and the insulin pathway from a fruit fly's viewpoint. *P Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. [https://doi.org/19\(2\):116-126](https://doi.org/19(2):116-126),.
- Doane, W. W. (1960). Developmental physiology of the mutant female sterile adipose of *Drosophila melanogaster*. I. Adult morphology, longevity, egg

- production, and egg lethality. *Journal of Experimental Zoology*, 145(1), 1-21.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401450102>
- Droujinine, I. A., & Perrimon, N. (2016). Interorgan communication pathways in physiology: focus on *Drosophila*. *Annual review of genetics*, 50, 539–570.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-121415-122024>
- Federación Internacional de Diabetes, Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª edición, (2019), ISBN: 978-2-930229-81-2. www.diabetesatlas.org
- Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. (2020). The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex.* 156(2):142-149. English. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000356>. PMID: 32285854.
- Gáliková, M., & Klepsatel, P. (2018). Obesity and aging in the *Drosophila* model. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1896.
<https://doi.org/10.3390/ijms19071896>
- Galenza, A., Hutchinson, J., Campbell, S. D., Hazes, B., & Foley, E. (2016). Glucose modulates *Drosophila* longevity and immunity independent of the microbiota. *Biology open*, 5(2), 165–173. <https://doi.org/10.1242/bio.015016>
- Gates, S. C., & Sweeley, C. C. (1978). Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/359193>.
- Gogna N, Krishna M, Oommen AM, Dorai K. (2014). Investigating correlations in the altered metabolic profiles of obese and diabetic subjects in a South Indian Asian population using an NMR-based metabolomic approach. *Mol Biosyst.* <https://doi.org/10.1039/c4mb00507d>.
- Granata I, Manzo M, Kusumastuti A, Guarracino MR. (2021). Learning from Metabolic Networks: Current Trends and Future Directions for Precision

Medicine. Curr Med Chem.
<https://doi.org/10.2174/0929867328666201217103148>.

Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *Gac Med Mex*. <https://doi.org/28474708>

Häder , T. ,Müller , S. ,Aguilera , M. ,Eulenberg , KG ,Steuernagel , A. ,Ciossek , T. ,Kühnlein , RP ,Lemaire , L. ,Fritsch , R. ,Dohrmann , C. (2003). Control del almacenamiento de triglicéridos por una proteína de dominio WD40 / TPR . *EMBO*. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor837>

Hong, Seung-Hyun & Kang, Moonyoung & Lee, Kyu-Sun & Yu, Kweon. (2016). High fat diet-induced TGF- β /Gbb signaling provokes insulin resistance through the tribbles expression. *Scientific Reports*. 6. 30265. <https://doi.org/10.1038/srep30265>.

Huang, J., Liao, Y., & Li, Y. (2019). Clinical features and microvascular complications risk factors of early-onset Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Medical Science*, 39(5), 754-758. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2102-7>

Instituto Nacional de Salud Pública (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. México. www.inegi.org.mx

Instituto Nacional de Salud Pública (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. México. www.inegi.org.mx

International Expert Committee. (2009). International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 32(7), 1327-1334. <https://doi.org/10.2337/dc09-9033>

Ishizuka K, Usui I, Kanatani Y, Bukhari A, He J, Fujisaka S, Yamazaki Y, Suzuki H, Hiratani K, Ishiki M, Iwata M, Urakaze M, Haruta T, Kobayashi M. (2007). Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of

cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*.
<https://doi.org/10.1210/en.2006-1702>.

Itskov, P. M., & Ribeiro, C. (2013). The dilemmas of the gourmet fly: the molecular and neuronal mechanisms of feeding and nutrient decision making in *Drosophila*. *Frontiers in neuroscience*, 7, 12.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00012>

J.C.. Wiebea, A.M.. Wägnera, F.J.. Novoa Mogollóna. (2011). Genética de la diabetes mellitus. *Nefrologíavol.*
<https://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10918>

Kim, J. Y., Park, J. Y., Kim, O. Y., Ham, B. M., Kim, H.-J., Kwon, D. Y., ... Lee, J. H. (2010). Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using Ultra Performance Liquid Chromatography and Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). *Journal of Proteome Research*, 9(9), 4368-4375.
<https://doi.org/10.1021/pr100101p>

Klotz, L.-O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., & Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology*, 6, 51-72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>

Klünder-Klünder, Miguel, Cruz, Miguel, García-Macedo, Rebeca, & Flores-Huerta, Samuel. (2014). Inflammatory cytokines adiponectin, resistin, IL-6 and IFN- γ are associated with insulin resistance in eutrophic and obese children. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 71(1), 8-14.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462014000100003&lng=es&tlng=en.

Korbecki, J., & Bajdak-Rusinek, K. (2019). The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflammation research: official journal of the European*

Histamine Research Society ... [et al.], 68(11), 915–932.
<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>

Ko, S.-H., & Cha, B.-Y. (2012). Diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus in Korea. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(1), 6-12.
<https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.1.6>

Lakhtakia, R. (2013). The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 13(3), 368-370. <https://doi.org/23984020>.

Laura Palanker Musselman, Jill L. Fink, Kirk Narzinski, Prasanna Venkatesh Ramachandran, Sumitha Sukumar Hathiramani, Ross L. Cagan, Thomas J. (2011). Baranski A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms* 4: 842-849;
<https://10.1242/dmm.007948>

Laura Palanker Musselman, Ronald P. Kühnlein (2018). *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease *Journal of Experimental Biology* 221: jeb163881. <https://doi.org/10.1242/jeb.163881>.

Li, H., & Tennessen, J. M. (2018). Preparation of *Drosophila* larval samples for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (136), 57847. <https://doi.org/10.3791/57847>

Li, H., & Tennessen, J. M. (2019). Quantification of D- and L-2-hydroxyglutarate in *Drosophila melanogaster* tissue samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1978, 155–165.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9236-2_10

Li, J., Mao, Y. S., Chen, F., Xia, D. X., & Zhao, T. Q. (2021). Palmitic acid up regulates Gal-3 and induces insulin resistance in macrophages by mediating the balance between KLF4 and NF-κB. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(3), 1028. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10460>

Li, L., Krznar, P., Erban, A., Agazzi, A., Martin-Levilain, J., Supale, S., ... Maechler, P. (2019). Metabolomics identifies a biomarker revealing in vivo loss of

- functional β -cell mass before diabetes onset. *Diabetes*, db190131. <https://doi.org/10.2337/db19-0131>
- Małodobra-Mazur M, Cierzniak A, Kaliszewski K, Dobosz T. (2021). PPARG Hypermethylation as the First Epigenetic Modification in Newly Onset Insulin Resistance in Human Adipocytes. *Genes* (Basel). <https://doi.org/10.3390/genes12060889>.
- Mamas, M., Dunn, W. B., Neyses, L., & Goodacre, R. (2011). The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of Toxicology*, 85(1), 5-17. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- Moore, S. C., Matthews, C. E., Sampson, J. N., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Zheng, W., Cai, Q., Tan, Y. T., Chow, W. H., Ji, B. T., Liu, D. K., Xiao, Q., Boca, S. M., Leitzmann, M. F., Yang, G., Xiang, Y. B., Sinha, R., Shu, X. O., & Cross, A. J. (2014). Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 10(2), 259–269. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0574-1>
- MORGAN, T. H. (1910). Sex limited inheritance in drosophila. *Science*, 32(812), 120. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Murillo-Maldonado, J. M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L. M., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2011). *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, 60(5), 1632-1636. <https://doi.org/10.2337/db10-1288>
- Murillo-Maldonado JM, Riesgo-Escovar JR. (2017). Development and diabetes on the fly. *Mech Dev*. Apr;144(Pt B):150-155. doi: 10.1016/j.mod.2016.09.004. Epub 2016 Oct 1. PMID: 27702607.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L., & Baranski, T. J. (2011). A high-sugar diet produces obesity

- and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 4(6), 842–849. <https://doi.org/10.1242/dmm.007948>
- Musselman, L. P., & Kühnlein, R. P. (2018), *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), jeb163881. <https://doi.org/10.1242/jeb.16388>
- Na, J., Sweetwyne, M. T., Park, A. S. D., Susztak, K. and Cagan, R. L. (2015). Diet-induced podocyte dysfunction in *drosophila* and mammals. *Cell Rep.* 12, 636-647. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.056Cross.
- Nässel, D. R., Kubrak, O. I., Liu, Y., Luo, J., & Lushchak, O. V. (2013). Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Frontiers in physiology*, 4, 252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00252>
- Newgard, C. B. (2017). Metabolomics and Metabolic Diseases: Where do we stand. *Cell Metabolism*, 25(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.018>
- Organización Mundial de la salud. (2020). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Organization, W.H., (2013). *global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Ortega-Loubon, C., Fernández-Molina, M., Singh, G., & Correa, R. (2019). Obesity and its cardiovascular effects. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 35(4), e3135. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3135>
- Park, S., Sadanala, K. C., & Kim, E. K. (2015). A metabolomic approach to understanding the metabolic link between obesity and diabetes. *Molecules and cells*, 38(7), 587–596. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0126>
- Pasco, M. Y., & Léopold, P. (2012). High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PloS one*, 7(5), e36583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036583>

- Pulinilkunnil T., Kienesberger P.C., Nagendran J., Sharma N., Young M.E., Dyck J.R. (2014). Cardiac-specific adipose triglyceride lipase overexpression protects from cardiac steatosis and dilated cardiomyopathy following diet-induced obesity. *Int. J. Obes. (Lond.)*; 38:205–215. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.103>.
- Rangel-Huerta OD, Pastor-Villaescusa B, Gil A. (2019). Are we close to defining a metabolomic signature of human obesity A systematic review of metabolomics studies. *Metabolomics*. 13;15(6):93. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1553>.
- Reaven, G. M. (2005). The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 391-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>
- Reis T. (2016). Effects of synthetic diets enriched in specific nutrients on *Drosophila* development, body fat, and lifespan. *PloS one*, 11(1), e0146758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146758>
- Samuel, V. T. & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>

- Secretaria de Salud del Estado de Querétaro. (2018). Estrategia Estatal para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes. <http://seseq.gob.mx>
- Simone C. da Silva Rosa, Nayak N, Caymo AM, Gordon JW. (2020). Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiol Rep.*:e14607. <https://doi.org/10.14814/phy2.14607>.
- Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J., & Thummel, C. S. (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.034>
- Titchenell, P. M. et al. (2016). Direct hepatocyte insulin signaling is required for lipogenesis but is dispensable for the suppression of glucose production. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.022>.
- Vázquez-Jiménez, J. G., Roura, A., Jiménez-Mena, L., & Olivares-Reyes, J. (2017). El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gaceta medica de Mexico*, 153, 852-863. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002714>
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S (2005); RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. Apr 16-22;365(9468):1389-97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66374-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66374-X).
- Vega-Robledo GB, Rico-Rosillo MG. (2019). Tejido adiposo: función inmune y alteraciones inducidas por obesidad [Adipose tissue: immune function and alterations caused by obesity]. *Rev Alerg Mex.* <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.589>. PMID: 31606018
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan

- GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids Research*, 35(Database issue), D521-D526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>
- Woodcock, K. J., Kierdorf, K., Pouchelon, C. A., Vivancos, V., Dionne, M. S., & Geissmann, F. (2015). Macrophage-derived upd3 cytokine causes impaired glucose homeostasis and reduced lifespan in *Drosophila* fed a lipid-rich diet. *Immunity*, 42(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.023>
- World Health Organization. (2016). *World Diabetes Report*. World Health Organization. Geneva, Suiza. www.who.int/diabetes/global-report
- Yamamoto, Y., Sakurai, T., Chen, Z., Inoue, N., Chiba, H., & Hui, S. P. (2022). Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. *Nutrients*, 14(3), 579. <https://doi.org/10.3390/nu14030579>
- Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*. 8152-8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>.
- Yazıcı D., Sezer H. (2017) Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. In: Engin A., Engin A. (eds) *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 960. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_12
- Ye J. (2021) Mechanism of insulin resistance in obesity: a role of ATP. *Front Med*. <https://doi.org/10.1007/s11684-021-0862-5>.

10 Anexo 1

C.U., Querétaro, 27 de mayo de 2020

No. de oficio. CBQ20/044

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Facultad de Química

Presente

At'n. Sofía Estrada Nieves

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado “**Aproximación metabolómica para el estudio de la transición obesidad-resistencia a la insulina en un modelo de *Drosophila melanogaster***”, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Dra. Minerva Ramos Gómez

Secretaria

Dr. Bah Mamadou Moustapha

Representante investigador