



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**El Papel de NALP1b1 en la
inflamación inducida por obesidad**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA LAURA VALDEZ HERNANDEZ



DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA
2013**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Valdez

Hernández

Ana Laura

Universidad Autónoma de México

Facultad de Ciencias Biología

2. Datos del tutor

Dr.

Pedraza

Alva

Martín Gustavo

3. Datos sinodal 1

Dra.

Macías

Silva

Marina

4. Datos sinodal 2

M. en C.

Aguilar

León

Diana Elodia

5. Datos sinodal 3

Dra.

Carvajal

Aguilera

Karla Guadalupe

6. Datos sinodal 4

Dr.

Covarrubias

Robles

Luis Fernando

7. Datos del trabajo escrito

El papel de NALP1b1 en la inflamación inducida por obesidad.

77p 2013

El Papel de NALP1b1 en la inflamación inducida por obesidad

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroinmunología, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo de una beca de alimentación y vivienda. Agradecemos el apoyo de DGAPA y CONACyT.

Agradecimientos

Al Dr. Gustavo Pedraza por darme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su tutoría, por compartir sus conocimientos, por el tiempo invertido en mi formación académica y por brindarme siempre su apoyo.

A la Dra. Leonor Pérez por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

A mi comité de sinodales: Dra. Marina Macías Silva, Dr. Covarrubias Robles Luis Fernando, Dra. Carvajal Aguilera Karla Guadalupe y M. en C. Aguilar León Diana Elodia por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, por sus críticas y aportaciones.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Neuroinmunología por su apoyo, consejos y por hacer placentera mi estancia en el IBT.

Oswaldo López por instruirme en técnicas del laboratorio y por su ayuda en la unidad del bioterio.

A Virginia Barajas por el apoyo técnico en el laboratorio.

A la Unidad del bioterio, en especial a Elizabeth Mata por su apoyo técnico.

Dedicatorias

A mi Padre y a mi Madre por el amor y el apoyo en las decisiones que he tomado en mi vida.

A mi hermana Gabriela por ser una gran amiga.

A mi hermano José Alfredo por transmitirme esa curiosidad que solo tienen los niños.

A Ángeles, Martha, Elsa, Patricia y Laura por su cariño y por siempre estar presente en cada etapa de mi vida.

A mis amigos: Wendy, Isaí, Susana, Valerie, Tonalli, Ernesto, Julio y Mayra. Por compartir sus consejos y su cariño. Por su amistad de varios años. Tenerlos en mi vida me hace muy feliz.

A Silvia Yepez por enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva y alentarme a cumplir mis sueños.

INDICE

RESUMEN.....	6
ABREVIATURAS.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Regulación del metabolismo energético.....	9
1.1.2 Vía de señalización de insulina.....	10
1.1.2.1 Vía PI3K.....	11
1.2 Obesidad.....	13
1.3 Dislipidemia.....	15
1.4 Diabetes.....	17
1.5 Estrés metabólico converge en la activación de JNK e IKK.....	19
1.6 Síndrome metabólico.....	20
1.8 Inflamación.....	22
1.8.1 Receptores de reconocimiento de patrones.....	23
1.8.1.1 NLRs.....	24
1.8.2 Papel patogénico de IL-1 β e IL-18 durante el desarrollo de obesidad y diabetes.....	27
1.8.3 NALP 1.....	28
2 ANTECEDENTES.....	31
3 HIPÓTESIS.....	34
4 OBJETIVOS.....	34
5 METODOLOGIA.....	35
5.1 Animales.....	35
5.2 Genotipificación.....	35
5.2.1 Extracción de DNA genómico.....	35
5.2.2 Reacción de PCR.....	36
5.2.3 Electroforesis de DNA en gel de Poliacrilamida 10%.....	36
5.3 Condiciones de alimentación: tiempo y tipo de dieta.....	37
5.4 Prueba de resistencia a insulina.....	38
5.5 Prueba de tolerancia a glucosa.....	38
5.6 Sacrificio de los ratones.....	38
5.6.1 Obtención de suero.....	39
5.7 Extractos Proteicos.....	39
5.8 Inmunoblott.....	39
5.9 ELISA.....	40
5.10 Niveles de insulina y lípidos en suero.....	41
5.10.1 Ensayo de quimioluminiscencia.....	41
5.10.2 Perfil lipídico.....	41
5.11 Cálculo del área bajo la curva (ABC).....	42
5.11.1 ABC - Tolerancia a glucosa.....	42
5.11.2 ABC – Resistencia a insulina.....	42
5.12 Análisis estadístico.....	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 Inducción de obesidad por una DAG.....	44
6.2 <i>Nalp1b1</i> previene la hiperglicemia inducida por la DAG.....	47
6.3 <i>NALP1b1</i> modifica la tolerancia glucosa y la producción de insulina en ratones obesos.....	48
6.4 <i>NALP1b1</i> modula la producción de IL-1 β	53
6.5 <i>NALP1b1</i> no altera la resistencia a insulina en ratones con obesidad.....	56

6.6 <i>NALP1b1 no altera el metabolismo de lipoproteínas</i>	59
7 DISCUSIÓN	61
8 CONCLUSIONES	71
9 REFERENCIAS	72

RESUMEN

La obesidad es un problema de salud pública mundial, más de la mitad (50.3%) de la población adulta padece de sobrepeso u obesidad. La obesidad resulta del desbalance entre el consumo y gasto de energía. Las alteraciones metabólicas presentes en varios órganos (páncreas, tejido adiposo, hígado, músculo cardíaco y tejido muscular) de individuos obesos resulta en el desarrollo de diabetes.

Recientemente se ha demostrado que la inflamación crónica (metainflamación) es crucial en la patogénesis de la obesidad. La inflamación es promovida por la expansión patológica del tejido adiposo. Este crecimiento induce una alta infiltración de macrófagos, los cuales secretan citocinas inflamatorias como IL-1 β e IL-18 que contribuyen a la resistencia a insulina y desarrollo de diabetes.

El procesamiento de las citocinas de la familia IL-1 como IL-1 β e IL-18, es mediada por la cisteína proteasa caspasa-1, la cual es activada por el complejo multiprotéico conocido como inflammasoma.

Diversos estudios demuestran que los ratones deficientes en componentes del inflammasoma como Nlrp3, ASC, y Casp1 tienen un menor desarrollo de ganancia de peso, hipertrofia de adipocitos, hiperinsulinemia e hiperresistinemia.

El inflammasoma de NALP3 es el principal sensor del exceso de lípidos. Sin embargo, en el tejido adiposo de los animales carentes de Nalp3 no se abate por completo la activación de caspasa-1 inducida por la dieta alta en grasa *in vivo*, lo que sugiere que otros inflamasomas como NALP1, NALP4 o NALP6 contribuyen a las fisiopatología de la obesidad.

Estudios previos han comprobado que la expresión del receptor NALP1 aumenta en tejido adiposo cuando se induce obesidad mediante una dieta alta en grasa.

Interesantemente, se ha observado que distintas cepas de ratones muestran diferencias en la susceptibilidad a desarrollar síndrome metabólico inducido por una dieta alta en grasa. Esto correlaciona con la expresión de distintos alelos del gen Nalp1b; por ejemplo, los ratones de la cepas C57BL/6 que expresan el alelo 2 son susceptibles a desarrollar diabetes en respuesta a una dieta alta en grasa,

en cambio los animales de la cepa Balb/c, que expresan el alelo 1 son resistentes a desarrollar diabetes.

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio mostramos que la expresión del alelo Nalp1b1 en ratones transgénicos de la cepa C57BL/6 (Nalp1b2) modula la magnitud de la metainflamación inducida por una dieta alta en grasa, en tejido adiposo y a nivel sistémico. Además favorece la homeostasis de la glucosa. El tejido adiposo de los animales transgénicos obesos (Nalp1b1/Nalp1b2) presentó menores niveles de caspasa-1 activa y de IL-1 β . Consistente con esto, a los tres meses de ser alimentados con la dieta alta en grasa los ratones transgénicos obesos (Nalp1b1/Nalp1b2) presentan niveles normales de insulina y regulan adecuadamente los niveles de glucosa en sangre en comparación con los animales silvestres (Nalp1b2). Estos resultados indican que las células beta pancreáticas de los animales transgénicos (Nalp1b1/Nalp1b2) debe de presentarse menor daño por inflamación lo que les permite secretar niveles normales de insulina y regular adecuadamente los niveles de glucosa. En base a nuestros resultados, proponemos que NALP1b1 regula negativamente la metainflamación, en respuesta señales de daño generadas durante el desarrollo de la obesidad y diabetes como exceso de lípidos o glucosa

la deposición de polipéptido amiloide insular o generación de especies reactivas de oxígeno.

ABREVIATURAS

ABC - Área bajo la curva

AKT – Proteína cinasa B

DAG – Dieta alta en grasa

DAMPs – Patrones moleculares asociados a daño

DN – Dieta normal

GLUT4 – Transportador de glucosa 4

GSK3 – Glucógeno sintasa cinasa 3

HDL – Lipoproteína de alta densidad

IAPP – Polipéptido amiloide insular

IKK – Cinasa Ikb

IL-1 – Interleucina 1

IRS – Substrato del receptor de insulina

JNK – Cinasa c-jun N-terminal

LDL – Lipoproteína de baja densidad

NLRP – Receptor tipo NOD

PAMPs – Patrones moleculares asociados a patógenos

PI3K – Fosfatidil inositol 3 cinasa

PRR – Receptores de reconocimiento de patrones

ROS – Especies reactivas de oxígeno

TLR – Receptores tipo Toll

TNF – Factor de necrosis tumoral

VLDL – Lipoproteína de muy baja densidad

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación del metabolismo energético

Toda actividad del cuerpo humano requiere energía y la glucosa es su principal fuente. Muchos órganos pueden almacenarla (síntesis de glucógeno), producirla (gluconeogénesis) o utilizarla (glucólisis). Sin embargo, algunos tejidos como el cerebro y los glóbulos rojos dependen del aporte directo de la glucosa circulante. El cerebro oxida alrededor de 120 g de glucosa diarios, que corresponde al 20% de gasto energético corporal diario. Por lo tanto es fundamental que los niveles de glucemia se mantengan estables (alrededor 90-100 mg/dL). Si baja a menos de la mitad, puede causar fallas en la función del cerebro, y si aumenta demasiado, se producen las complicaciones crónicas propias de enfermedades como la diabetes. La insulina producida por las células β en los islotes del páncreas, es la principal hormona responsable de mantener los niveles de glucemia estables, tanto en los periodos de ayuno como en los postprandiales [1].

Cuando la glucosa llega a la circulación sanguínea desde el intestino, después de una comida rica en glúcidos, el consiguiente aumento de glucosa en sangre provoca un aumento de la secreción de insulina y una disminución de glucagón. La liberación de insulina por el páncreas está regulada por el nivel de glucosa en la sangre que llega al páncreas. Las hormonas peptídicas insulina, glucagón y somatostatina se producen en los grupos de células pancreáticas especializadas, conocidas como islotes de Langerhans. Cada tipo de célula de los islotes produce una sola hormona: las células α producen glucagón, las células β insulina y las células δ somatostatina. Cuando aumenta la glucosa sanguínea, los transportadores GLUT2 transportan glucosa a las células β , en donde es convertida a glucosa 6-fosfato por la hexoquinasa IV (glucoquinasa) y entra a glucólisis. El incremento en la velocidad del catabolismo de la glucosa aumenta la concentración de ATP, lo que hace que se cierren los canales de K^+ regulados por ATP de la membrana plasmática. La reducción en la salida de K^+ despolariza

la membrana, abriendo con ello los canales de Ca^{2+} de compuerta regulada por voltaje de la membrana plasmática. La consiguiente entrada de Ca^{2+} provoca la liberación de insulina por exocitosis. Estímulos procedentes de los sistemas nerviosos parasimpático y simpático estimulan e inhiben, respectivamente, la liberación de insulina. Un bucle de retroalimentación limita la liberación hormonal: la insulina disminuye la glucosa sanguínea por estimulación de la captación de glucosa por los tejidos; la célula β detecta la disminución de glucosa en sangre por la disminución de la reacción hexoquinasa; esto hace que la liberación de insulina se haga más lenta o cese. Esta regulación por retroalimentación mantienen la concentración de glucosa casi constante a pesar de grandes fluctuaciones después de la ingesta [2].

1.1.2 Vía de señalización de insulina

La insulina promueve una gran variedad de respuestas biológicas, entre ellas la habilidad de estimular la disponibilidad de glucosa en la sangre, principalmente en tejidos blanco como músculo esquelético y el tejido adiposo, donde la glucosa es oxidada y almacenada como glicógeno o ácidos grasos [3].

El receptor de insulina (RI) reside en la membrana plasmática y pertenece a una amplia familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de tirosina cinasa (RTK), los cuales al ser estimulados se autofosforilan en residuos de tirosina [4]. El IR es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades extracelulares α y dos subunidades transmembranales β , las cuales están unidas mediante puentes disulfuro [4, 5]. Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen los sitios de unión a insulina. Por otra parte las subunidades β contienen los sitios de unión a ATP y los sitios de autofosforilación en la región juxtamembranal (Tyr960), la región regulatoria (Tyr1146 Tyr1150 y Tyr1151) y la región carboxilo terminal (Tyr1316 y Tyr1322) [6]. Esta autofosforilación ocurre a través de mecanismos de transfosforilación en los cuales la insulina se une a la subunidad α del dímero $\alpha \beta$ y estimula la fosforilación de la subunidades β adyacentes que se encuentran unidas covalentemente. El mecanismo de autofosforilación se da por procesos cis y trans mediante los cuales ciertos residuos son fosforilados por la actividad

fosfotransferasa de la subunidad β (cis-) mientras que otros son sustrato de la actividad de la cinasa de la subunidad β opuesta (trans-) [7].

La señalización de insulina involucra una compleja cascada río abajo del receptor de insulina. La señalización de la cascada desencadena en dos principales vías: La primera es la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas); La segunda involucra a fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y a AKT. Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, la expresión genética y efectos mitogénicos [8].

1.1.2.1 Vía PI3K

La unión de insulina a su receptor resulta en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) [9]. Las proteínas IRS están compuestas por el dominio de homología a pleckstrina (PH) y el dominio de unión a fosfotirosina (PTB) seguido de una cola de tirosina y sitios de fosforilación Ser/Thr. El dominio PTB COOH-terminal se une directamente al motivo fosforilado NPXY de la subunidad β del receptor de insulina [10]. El dominio PH NH₂-terminal de IRS facilita la unión entre las proteínas blanco como fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) o la proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento (Grb2) y fosfolípidos de membrana como PIP₃ a los receptores de insulina activados. Durante la interacción con el receptor de insulina, las proteínas IRS son fosforiladas en varios residuos de tirosina por el receptor de tirosina, creando sitios de unión para proteínas con dominios SH₂ [4]. La proteína adaptadora PI3K, la cual se une a IRS, consta de una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110, la cual fosforila fosfatidilinositol 3,4 bifosfato PIP₂ en la posición 3 para producir fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato PIP₃. PIP₃ reclutan a Akt también conocida como (PKB) a través de su dominio PH [11]. Akt es una proteína de 60 KDa constituida por un dominio PH NH₂-terminal, un dominio cinasa y un dominio regulatorio COOH-terminal [3].

Akt es activada mediante la fosforilación de dos sitios clave: Thr308 en el dominio catalítico a través de la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1(PDK1), la cual se recluta a la membrana a través de interactuar con PIP₃ también generado por la

acción de PI3K, y la fosforilación de Ser473 en el dominio regulatorio COOH-terminal a través de PDK2, un complejo conocido como mTor/Rictor [12].

Uno de los blancos de Akt es la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3), la cual regula varios procesos celulares incluyendo la síntesis de proteínas y glicógeno. La vía de señalización PI3K promueve la síntesis de glicógeno inactivando a GSK3 a través de la fosforilación en Ser21 (GSK3 α) y Ser9 (GSK3 β), respectivamente [3]. Además Akt también fosforila al factor de transcripción FOXO-1, lo cual resulta en su exclusión del núcleo, previniendo la activación de varios genes como la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la glucosa-6 fosfatasa en hígado, dos importantes enzimas involucradas en la gluconeogénesis. Finalmente Akt promueve el consumo de glucosa induciendo la translocación del transportador de glucosa en la membrana plasmática [11]. Akt fosforila a AS160 (substrato de Akt 160KDa), el cual regula negativamente a proteínas G pequeñas de la familia de Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular del transportadores de glucosa (GLUT) en tejidos sensibles a insulina. Una vez que AS160 es fosforilada se inhibe su función, incrementando el tráfico dependiente de Rab del transportador de glucosa a la membrana GLUT4, el cual solo se expresa en músculo y tejido adiposo[13].

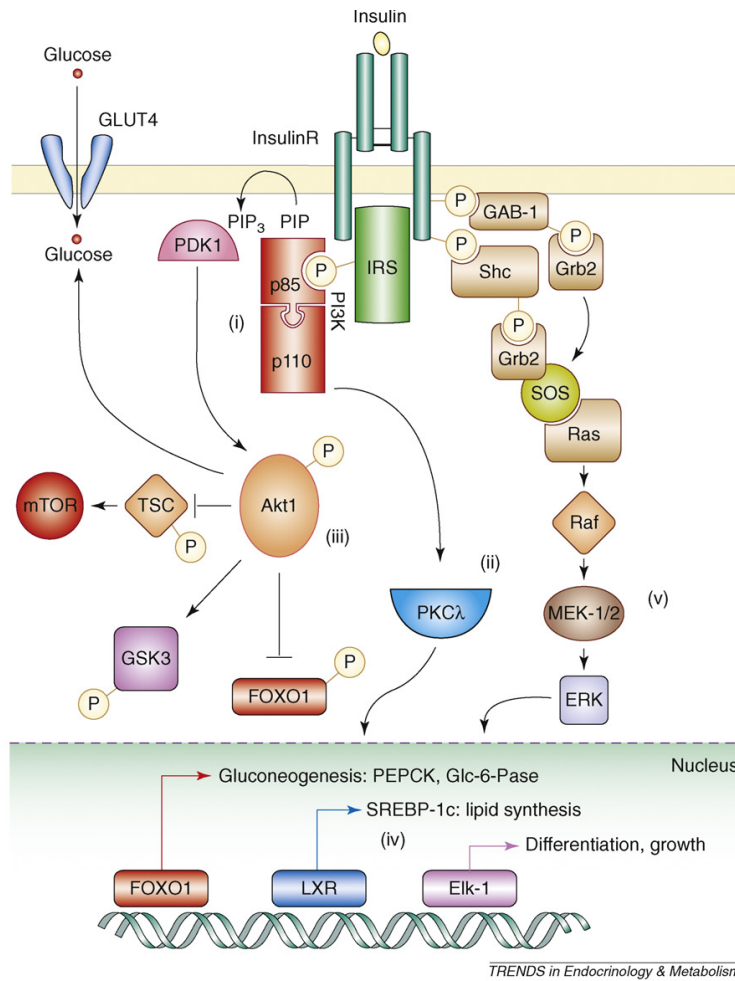


Figura.1 Vía involucradas en la señalización de insulina [14].

1.2 Obesidad

Los mamíferos además de mantener una homeostasis en los niveles de glucosa para tener un aporte constante y estable de energía, han evolucionado para almacenarla con el fin de garantizar su sobrevivencia durante periodos de sequía y hambre [15]. La composición corporal solo puede permanecer estable si se oxida una mezcla de sustratos igual (no solo en cantidad sino en calidad) a la mezcla de macronutrientes ingeridos. La homeostasis de la energía depende del balance entre las calorías consumidas y el gasto de energía. Las calorías consumidas dependen solamente del consumo de comida (incluyendo solo lo absorbido), mientras que el gasto de energía depende del metabolismo basal, la actividad física (voluntaria o involuntaria) y la termogénesis adaptativa. La obesidad es el resultado de ingerir más calorías en la dieta de las utilizadas en las actividades fisiológicas que consumen energía [16].

La obesidad se define como una enfermedad multifactorial que se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo y el correspondiente aumento del peso corporal [17]. El índice de masa corporal IMC = peso (Kg) /talla (m²) se utiliza para determinar el estado de nutrición en que se encuentra una persona. El peso ideal se diagnostica como IMC igual o menor que 25 Kg/ m² cuando es mayor se considera que es preobesa y si es igual o mayor a 30 Kg/ m² es obesa. El trastorno de la obesidad tiene su origen en la acumulación de grasa en el tejido adiposo [18].

El tejido adiposo es una mezcla heterogénea de adipocitos, preadipocitos estromales, células inmunes y endotelio [19]. En combinación, el tejido adiposo funciona como un complejo órgano endocrino que envía y recibe señales para modular la utilización de reservas de energía, el apetito, la sensibilidad a insulina, funciones reproductivas y la inflamación [20]. Los factores que secreta son conocidos como adipocinas, estas incluyen proteínas secretadas únicamente por los adipocitos como leptina y adiponectina; citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y moléculas angiogénicas y vasoactivadoras [19].

Dos mecanismos diferentes pueden inducir el aumento del tejido adiposo: la hipertrofia (incremento en el volumen de los adipocitos) o hiperplasia (incremento en el número de adipocitos). Es necesario establecer una distinción entre una expansión saludable y una patológica del tejido adiposo. La expansión saludable es el crecimiento de la masa adiposa a través del reclutamiento de precursores de células adiposas y células estromales, que se caracteriza por un proceso de vascularización mínimo y baja deposición de matriz extracelular y por tanto inflamación mínima. En contraste, la expansión patológica se caracteriza por crecimiento acelerado de las células adiposas, alta infiltración de macrófagos, desarrollo limitado de vasos y fibrosis masiva. Esta expansión patológica esta asociada con una inflamación crónica, la cual resulta en el desarrollo de resistencia a insulina [21].

Se ha sugerido que la necrosis de los adipocitos conducen a la hipertrofia, lo que promueve la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, los cuales se

distribuyen en forma de corona (Crown-like structures CLSs) que rodea a los adipocitos necróticos. Esta distribución es característica de la obesidad avanzada. En este estado los macrófagos, se fusionan para fagocitar los residuos de gotas de lípidos, formando un sincicio multinucleado durante el proceso, lo cual se ha asociado con un estado inflamatorio crónico [22].

La hipertrofia en los adipocitos crea un área local en el tejido adiposo de microhipoxia durante las primeras etapas de la expansión. Se ha observado que en humanos el tejido adiposo es pobremente oxigenado en estado obeso. Se ha sugerido que los niveles de varias adipocinas como MIF, IL-6, Anglt4, PAI-1, VEGF y leptina y las metaloproteínas de matriz MMP2, MMP9 se regulan positivamente en la hipoxia [23].

Los ácidos grasos se almacenan en forma de triglicéridos en el tejido adiposo y son liberados de adipocitos hipertróficos a través de la lipólisis durante el ayuno. Algunos de estos ácidos grasos liberados son desviados al hígado y almacenados en gotas lipídicas, mientras que otros son oxidados en otros órganos [24]. Sin embargo, niveles elevados de ácidos grasos en plasma pueden inducir una respuesta inflamatoria mediante la unión a receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo toll (TLRs). Se ha descrito que esfingolípidos como la ceramida es un ligando del TLR4, y la activación resultante promueve indirectamente la resistencia a insulina en hígado y en músculo [25].

Además se ha determinado que altas tasas de lipólisis o un alto flujo de ácidos grasos saturados causan inflamación temporal en el tejido adiposo [23].

1.3 Dislipidemia

Los lípidos obtenidos de la dieta como el colesterol, son absorbidos por enterocitos en el intestino, para después ser empaquetados con triglicéridos formando estructuras conocidas como quilomicrones. Algunos triglicéridos son hidrolizados en la circulación y apoproteínas como ApoE se adicionan a los quilomicrones los cuales se transportan hacia el hígado.

Los hepatocitos por su parte, secretan lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), estas son procesadas en circulación como lipoproteínas de baja densidad (LDL), la proteína principal que transporta colesterol a las células periféricas.

Cuando hay un exceso de colesterol, se liberan proteínas de alta densidad (HDL), también derivadas de la síntesis hepática. Las HDL regresan lípidos al hígado a través de la secreción de bilis y la reabsorción de lípidos en el intestino [26].

La dislipidemia la cual se define como la desregulación del metabolismo de lipoproteínas, incluyendo su sobreproducción y deficiencia, se caracteriza por elevado colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos o por el decremento de lipoproteínas de alta densidad (HDL) [27].

La señalización por lípidos tiene una función crucial en la progresión de la obesidad. El constante exceso de nutrientes, en particular de ácido grasos son suficientes para inducir resistencia a insulina y activar respuestas inflamatorias. Un lípido que es sobreproducido como resultado del incremento de ácidos grasos es la ceramida. La ceramida contribuye a la resistencia a insulina a través de múltiples vías; Activa la proteína fosfatasa (PP2A), la cual inactiva a AKT, atenuando la respuesta a insulina. Además la ceramida activa a PKC, inhibiendo la translocación a la membrana a través de la fosforilación de la treonina 34 del dominio de homología a plecstrina (PH) de AKT [28].

La obesidad y la diabetes tipo II se han asociado con el incremento de lípidos en plasma. La obesidad resulta en un aumento en el flujo de ácidos grasos en la circulación y aumenta su utilización por miocitos y hepatocitos. Los ácidos grasos son metabolizados para oxidación o almacenamiento. Cuando los ácidos grasos exceden de la capacidad para ser metabolizados en estas dos vías, los intermediarios (diaciglicerol, ácido lisofosfatídico, ceramida) se acumulan. Estos intermediarios activan a cinasas de serina que regulan negativamente la acción de la insulina [29]. La sobrecarga de lípidos en músculo esquelético, hígado, islotes pancreáticos y miocardio, resultante del aflujo de ácidos grasos en cantidad superior a las necesidades oxidativas de aquellos tejidos, aumenta el flujo metabólico para las vías perjudiciales del metabolismo oxidativo, causando la resistencia a insulina, esteatosis hepática, diabetes tipo 2 y disfunción cardíaca [1].

1.4 Diabetes

La acumulación de lípidos en tejido no destinado para el almacenamiento de grasas como músculo e hígado, puede bloquear la disponibilidad de glucosa.

Se ha establecido que la deposición de lípidos miocelulares son un marcador de resistencia a insulina [28].

La resistencia a insulina suele preceder a situaciones patológicas como la diabetes mellitus o el síndrome metabólico y esta asociada a circunstancias de obesidad. [30]. La diabetes tipo I y II son enfermedades con distinta etiología. La diabetes tipo I resulta de una destrucción autoinmune de las islas β pancreáticas, mientras de la diabetes tipo II involucra la constelación de desordenes metabólicos incluyendo la resistencia a insulina, la desregulación de la producción de glucosa hepática y la alteración de las funciones de las células β pancreáticas [31].

La resistencia a insulina (RI) se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o tejido adiposo[32].

La diabetes tipo 2 se caracteriza por alteraciones en la homeostasis de la glucosa incluyendo: (1) La capacidad de secretar insulina tanto en forma aguda como de manera sostenida (2) la capacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa hepática y promover el aprovechamiento periférico de la glucosa (sensibilidad a la insulina) y (3) de la capacidad de la glucosa para entrar en las células aún en ausencia de insulina[33]. Cuando los niveles de glucosa en sangre son muy elevados y las células β ya no son capaces de responder con un exceso de secreción de insulina, se pierde la fase de compensación y se inicia la hiperglicemia. Inicialmente la elevación de la glucosa es moderada e identifica un estado intermedio entre la normalidad y la diabetes, que se considera como prediabetes (100-125 mg/dL); si los niveles de glucosa en sangre aumentan se diagnostica diabetes (>126 mg/dL) [1].

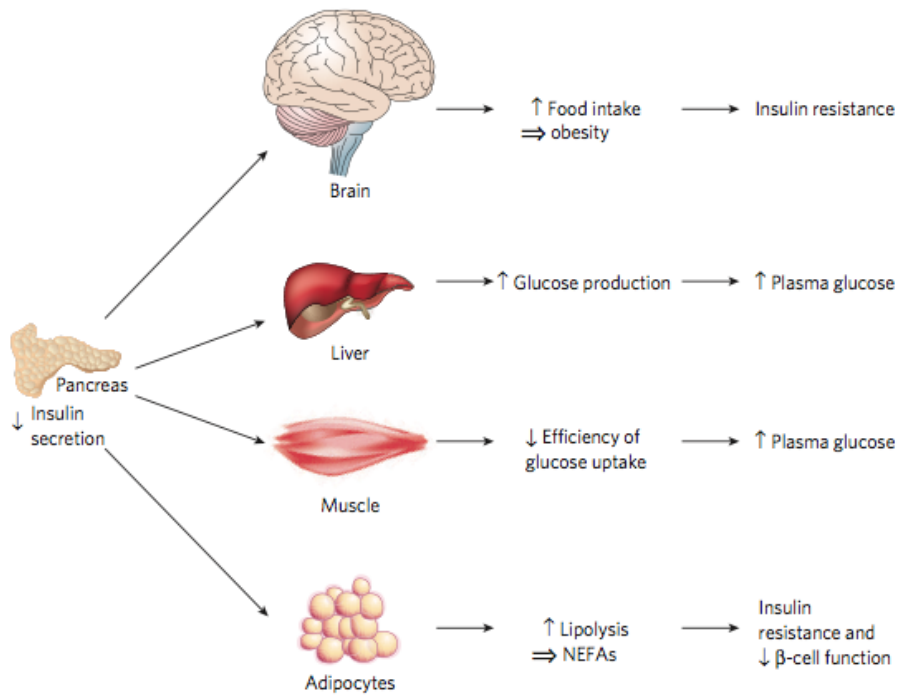


Figura 2. Modelo de las consecuencias de la deficiencia en la secreción de insulina asociado a la obesidad y la diabetes tipo 2[34].

En respuesta a la falta de eficacia de la insulina, las células β pancreáticas incrementan la liberación de insulina para mantener así un nivel normal de tolerancia a la glucosa. La hiperinsulinemia compensatoria, resultante de la resistencia a la insulina es considerada como un posible factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión arterial, diabetes tipo 2, dislipidemia, obesidad, disfunción endotelial y aterosclerosis a través de mecanismos interrelacionados [35].

La resistencia a insulina resultante de la obesidad es un reflejo del exceso de nutrientes por un largo periodo y se manifiesta a través de mecanismos complejos y heterogéneos que involucran el incremento de ácidos grasos, exceso de nutrientes, microhipoxia en tejido adiposo, estrés en el retículo endoplásmico, secreción de citocinas derivadas de tejido adiposo, inflamación crónica en tejido adiposo e hígado [29]. El incremento en los niveles de glucosa y de ácidos grasos pueden provocar la muerte de las células β y la acción de la insulina a lo que se le conoce como glucolipototoxicidad [34].

La magnitud de la reducción de las células β en la diabetes tipo 2 correlaciona con la falta de respuesta en la secreción de insulina. Este fenómeno se basa en observaciones tales como: En la diabetes tipo 2, las células β no son capaces de secretar insulina eficientemente en respuesta a glucosa intravenosa a pesar de que exista una producción de insulina. Además se ha determinado que las células β se reducen en un 50%, lo cual no es directamente proporcional a la función secretora por que en este nivel de diabetes tipo 2, las células operan menos del 25% de su capacidad funcional [34]. Las deficiencias en la secreción de insulina (Fig. 2) resultan en la disminución de los niveles de insulina en circulación y el decremento de la señalización de células sensibles a insulina en el núcleo arcuato del hipotálamo, en especial una población que expresa proopiomelanocortina, las neuronas POMC, causando un mayor consumo de comida y de ganancia de peso[36]. Además se promueve el decremento en la producción de glucosa hepática, reduce la eficiencia de almacenamiento de glucosa en músculo, y aumenta la lipólisis en adipocitos, resultando en un aumento de ácidos grasos circulando en el plasma [34].

1.5 Estrés metabólico converge en la activación de JNK e IKK

Las perturbaciones generadas durante el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 causan estrés metabólico que se genera de forma intracelular o extracelular. El estrés metabólico generado vía intracelular se asocia con estrés del retículo endoplásmico y estrés oxidativo, mientras que el estrés generado vía extracelular se asocia con la alta producción de citocinas pro-inflamatorias, y altos niveles de insulina y de ácidos grasos. Estos agentes estresantes inducen resistencia a insulina o deficiencias en las células β a través de la activación de cinasas activadas por estrés incluyendo la cinasa de Jun N-terminal (JNK) o la $\text{I}\kappa\text{B}$ cinasa β (IKK β) en tejido adiposo, músculo e hígado en modelos de obesidad [37].

La activación de JNK a través de la señalización de citocinas, lípidos, ROS o proteína reclutadora de inositol (IRE1) activada por el estrés del RE induce la fosforilación de serinas que inhiben la señalización de insulina. La proteína cinasa del retículo endoplásmico (PERK), también activa a IKK e inhibe la acción de la insulina medida por $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Fig.3) [38]. Además IKK β activa el factor de

transcripción nuclear κB y así la expresión de sus genes blanco como citocinas pro-inflamatorias, en hígado y tejido adiposo. Estas citocinas, incluyendo TNF, IL-6 e IL-1 β , promueven resistencia a insulina en los tejidos donde es producida, como hígado y tejido adiposo, y pueden ser transportadas a través de la circulación y afectar sitios distantes, incluyendo vasos, músculo esquelético y cardiaco, riñones y leucocitos [39].

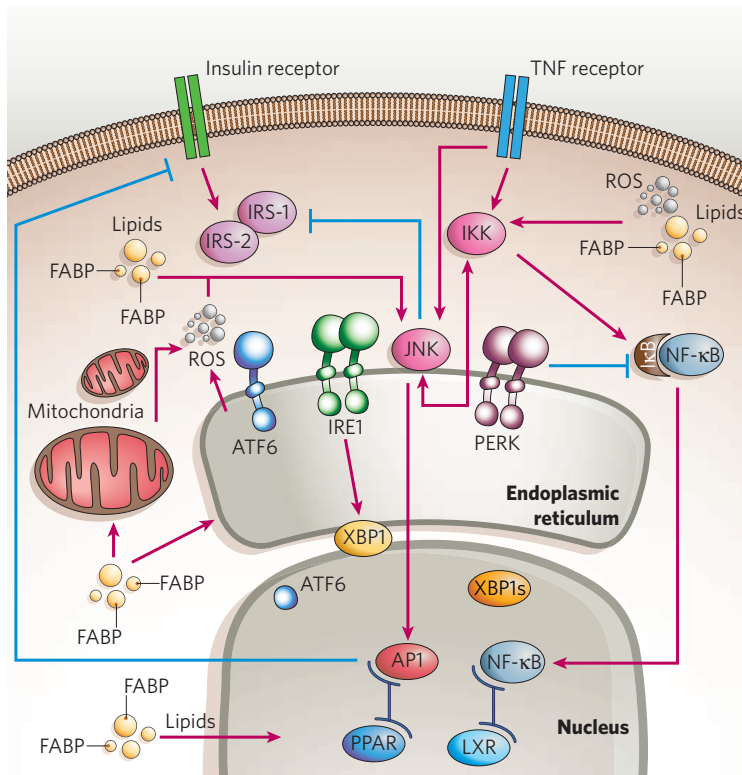


Figura 3. Vías moleculares activadas por el estrés metabólico y respuestas inflamatorias que convergen en la alteración de la cascada de señalización de insulina [40].

1.6 Síndrome metabólico

La constelación de anomalías metabólicas asociadas a la obesidad, incluyendo diabetes tipo 2 (intolerancia a glucosa), resistencia a insulina, dislipidemia e hipertensión en conjunto se define como síndrome metabólico.

La etiología de este síndrome es multifactorial, la genética y los factores del medio ambiente (estrés crónico, inactividad física, dieta, tabaco) desempeñan un papel importante [41].

El diagnóstico del síndrome metabólico requiere que coexistan al menos intolerancia a glucosa y/o resistencia a insulina más alguna de las siguientes alteraciones: HTA \geq 140/90 mmHg, dislipemia definida por hipertrigliceridemia >1.7 mmol/l o descenso del colesterol HDL (varones: 0.9 mmol/l; mujeres: 1 mmol/l), obesidad central o visceral, microalbuminuria (cociente albúmina/creatinina: Varones: 2.5 mg/mmol; Mujeres: 3.5 mg/mmol) [42].

El síndrome metabólico se asocia con alteraciones metabólicas en diferentes órganos (páncreas, tejido adiposo, hígado, cardíaco y tejido muscular) que inducen una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado la cual se ha denominado metainflamación (inflamación provocada metabólicamente). Esta condición es principalmente generada por el excedente de nutrientes (Ej. Lípidos como palmitato y ceramida, glucosa, aminoácidos) que activa moléculas y vías de señalización involucradas en la inflamación clásica [40].

1.7 Metainflamación

Durante el desarrollo de la obesidad, la morfología y la propiedades del tejido adiposo cambian dramáticamente. Además de la presencia de hipertrofia causada por aumento de lípidos, induce una alta infiltración de macrófagos al tejido adiposo y secreción alterada de adipocinas [43].

En relación a la metainflamación se ha descrito que la expansión del tejido adiposo no solo aumenta el grado de infiltración de macrófagos del tejido adiposo, sino que además provoca un cambio de polarización de los macrófagos que pasan de ser tipo M2, con un perfil secretor anti-inflamatorio, a tipo M1, con un perfil secretor proinflamatorio [44]. Se ha sugerido que los macrófagos M1 promueven la resistencia a insulina y los macrófagos M2 evitan la resistencia a insulina a través de la supresión de la inflamación, además de favorecer actividades homeostáticas como la remodelación del tejido adiposo y la eliminación de células apoptóticas, previniendo la hipoxia y la necrosis celular (Fig. 4) [45].

En estado magro, los macrófagos residentes son polarizados en un estado M2, el cual se caracteriza por expresar F4/80, CD301, IL-10 y arginasa, esta combinación preserva las funciones normales del tejido, promoviendo la reparación del tejido y la angiogénesis. Mientras que los macrófagos estimulados por IFN γ secretado por células Th1, expresan un repertorio proinflamatorio, el cual incluye, CD11c, TNF, IL-6, iNOS, especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios de nitrógeno[21].

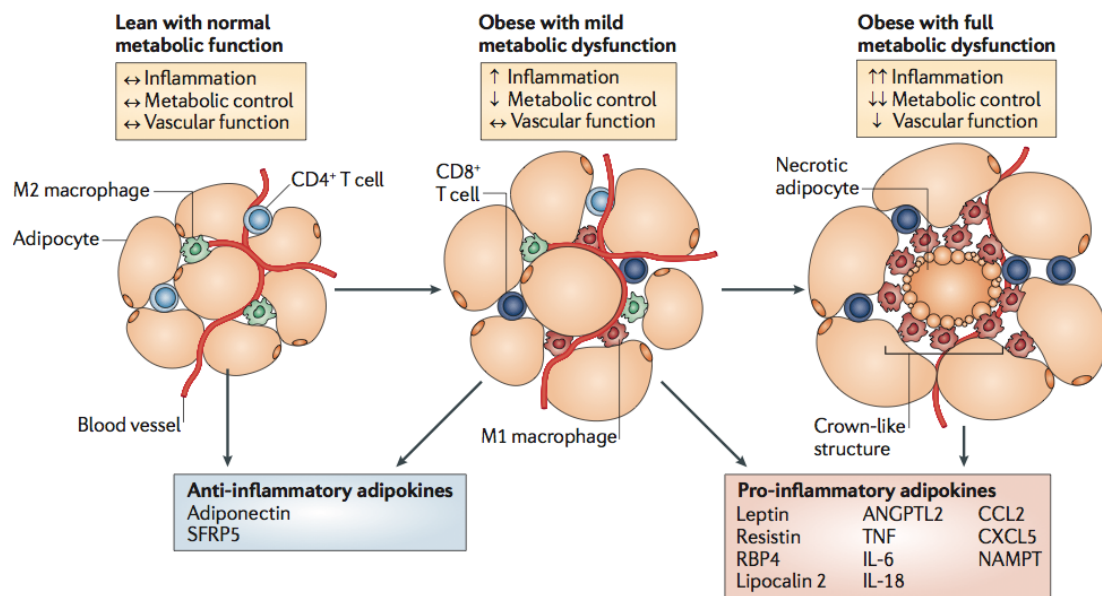


Figura 4. Modulación fenotípica del tejido adiposo [45].

1.8 Inflamación

La inflamación es una respuesta normal a una perturbación en la homeostasis causada por una infección o una herida. El sistema inmune es activado para neutralizar la invasión de patógenos, remover el tejido dañado y promover la reparación tisular [46].

La inflamación que resulta de un trauma, lesión por isquemia y reperfusión se ha denominado inflamación estéril. Similar a la inducida por microorganismos, la inflamación estéril se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas.

La inflamación puede ser aguda, por ejemplo en respuesta a daño tisular o puede ser crónica, provocando consecuencias patológicas. La inflamación aguda en respuesta a una herida que destruye el parénquima y afecta a los vasos sanguíneos, activa el sistema de coagulación, el cual comienza a promover la permeabilidad vascular, la adhesión y reclutamiento de leucocitos. La activación de las plaquetas también produce factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual activa a fibroblastos y actúa como atrayente para leucocitos. La infiltración de leucocitos, primero neutrófilos y después macrófagos, permite la eliminación de células muertas y residuos. Estas células secretan quimiocinas y citocinas como TNF α e IL-1, que regula positivamente la expresión de moléculas de adhesión para aumentar el reclutamiento de células del sistema inmune e induce la producción de factores de crecimiento y proteasas por los macrófagos. La liberación de proteasas incluyendo metaloproteasas permite la degradación de matriz extracelular y permite la remodelación del tejido. La remodelación del tejido es acompañada por la regeneración del parénquima y de la capa epitelial con la resolución del proceso de curación. La inflamación crónica, que ocurre cuando un agente no es eliminado o contenido adecuadamente, generalmente es perjudicial para el organismo ya que la producción sostenida de especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y factores de crecimiento resultan en la destrucción de tejido, proliferación de fibroblastos, acumulación aberrante de colágeno y fibrosis [47].

1.8.1 Receptores de reconocimiento de patrones

Existen varias clases de receptores que son importantes para detectar la presencia de microorganismos y el daño tisular. Estos receptores han sido denominado receptores de reconocimiento de patrones. Estos receptores reconocen estructuras conservadas de especies microbianas, la cuales son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y también moléculas endógenas liberadas de células dañadas, conocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Hasta ahora se ha identificado 5 clases

de receptores. Estas familias incluyen receptores transmembranales como los receptores tipo toll (TLRs) o los receptores leptina tipo C (CLRs); receptores citosólicos: como los receptores tipo RIG (RLRs), los receptores ausentes de melanoma-2 (AIM2) y receptores tipo NOD (NLRs) [48]. Después de reconocer algún PAMP o DAMP, estos receptores activan vías de señalización como la del factor nuclear- κ B (NF- κ B), la de las MAP cinasa (MAPK) y la vía del interferón I. Los cuales resultan en la regulación positiva de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas iniciando así el proceso inflamatorio [49].

1.8.1.1 NLRs

La familia NLR NACHT tiene tres subfamilias : la subfamilia de los receptores NOD (NOD1-2, NOD3/ NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), la subfamilia de IPAF (NLRC4) y NAIP y la sufamilia de los NLRPs (NLRP1-14, también conocidos NALPs) (Fig. 5) [50].

Los receptores tipo NOD son proteínas que se caracterizan por presentar una arquitectura tripartita. Estos contienen un dominio central de acoplamiento nucleotídico muy conservado llamado NACTH, el cual es esencial para la oligomerización de la molécula, seguido de un dominio C-terminal que incluye varias repeticiones ricas en leucina (LRR), el cual tiene como función el reconocimiento del ligando. El tercer dominio, N- terminal, es variable, pueden presentar un dominio CARD (reclutamiento de caspasa) o un dominio PYD (dominio de pirina) [51].

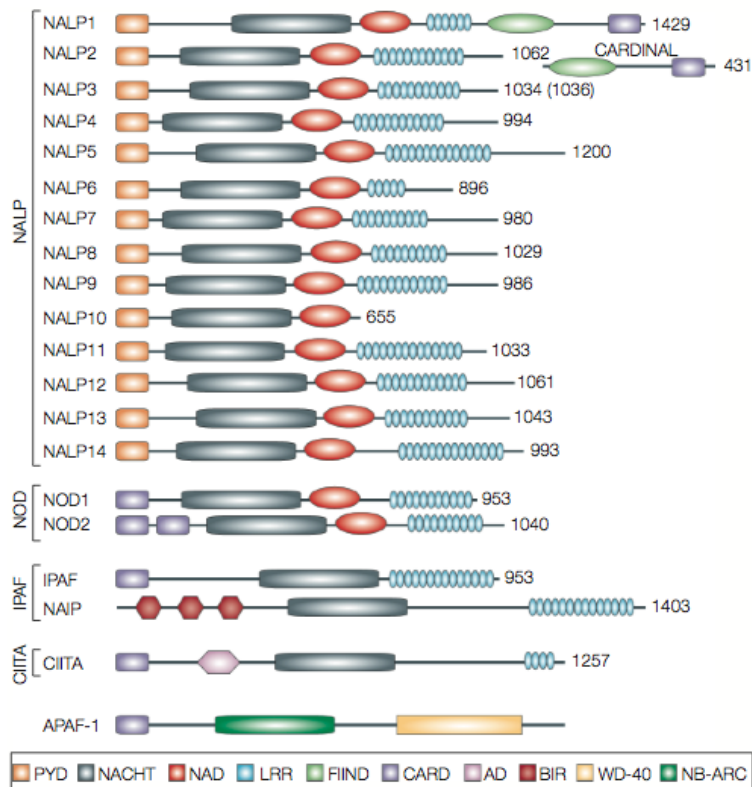


Figura 5. Representación esquemática de la estructura básica de los NLRs.

PYD= Dominio de pirina; NACHT= Dominio de acoplamiento nucleotídico; NAD= Dominio asociado a NACHT; LRR= Dominio rico en repeticiones de leucina; FIIND= Dominio función por encontrar; CARD= Dominio de reclutamiento de caspasa; AD= Dominio de activación; BIR= Repetición IAP del baculovirus WD-40= Repetición de la región WD-40 NB-ARC= Dominio de unión a nucleótidos APAF-1, productos del gen R y CED[52].

1.8.1.1.1 Inflamasoma

La función más importante de los NLRs es la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β IL-18 a través de la formación de plataformas conocidas como inflamasomas [53]. Los NLRs detectan motivos intracelulares para identificar PAMPs o DAMPs en el citosol. Se considera que el dominio LRR detecta los PAMPs o DAMPs por un mecanismo poco comprendido, pero hasta ahora no existe evidencia que indique que este dominio se una directamente al ligando. Después de este evento los NLRs se oligomerizan a través de sus dominios NACHT, esta oligomerización facilita el reclutamiento de pro-caspasa-1 a través de interacciones directas entre los dominios CARDS de los NLRs y pro-caspasa-1. Existen NLRs que carecen de dominios CARDS pero tienen dominios PYD, que

requieren de proteínas adaptadoras como ASC para interactuar con pro-caspasa-1. El dominio PYD de ASC interactúan con el PYD del NLR, mientras que el dominio CARD de ASC recluta a pro-caspasa-1[54]. Una vez que pro-caspasa-1 es reclutada se forma un complejo multiproteico de aproximadamente 700 KDa, conocido como el inflamasoma [53].

La proximidad entre las unidades de pro-caspasa-1 induce su autoproteólisis. Inicialmente pro-caspasa-1 esta conformada por la subunidad p35 y el fragmento p10. Subsecuentemente, el fragmento p35 se procesa por un corte proteolítico y genera la subunidad p20; dos moléculas p20 se heterodimerizan con dos moléculas p10, formando así la molécula de caspasa-1 enzimáticamente activa. Los principales sustratos de caspasa-1 son las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18, las cuales en sus formas maduras, median respuestas como la angiogénesis, el reclutamiento de neutrófilos para eliminar los desechos celulares e inducen la producción de citocinas en diferentes células del sistema inmune innato y adaptativo [55] . En los basófilos, IL-18 induce la producción de IL-4 e IL-13 cuando se combina con un segundo estímulo como IL-3; En los mastocitos IL-1 e IL-18 regulan positivamente la secreción de IL-3, IL-5, IL-6 y TNF, solo en presencia de una señal adicional como IgE o IL-3; En las natural killer (NK) IL-18 aumenta la producción de IL-4,IL-5,IL-13, GM-CSF y TNF [56].

Diferentes estudios revelaron que la activación de los inflamasomas, síntesis, procesamiento, liberación y maduración de las citocinas IL-1 β e IL-18 en macrófagos *ex vivo* se observó que se requieren de dos estímulos: un estímulo inicial (priming) que induce la transcripción y síntesis de citocinas inmaduras y un segundo estímulo que activa al inflamasoma [57].

Aunque la inflamación es un proceso agudo que, como ya se mencionó, permite contender con agentes patógenos y la reparación del tejido en situaciones traumáticas, recientemente también se ha encontrado que la inflamación se puede activar en un contexto metabólico alterado. La naturaleza de las señales que activan al inflamasoma en el contexto metabólico no se han descrito completamente, sin embargo, varias señales de estrés han sido implicadas en la activación del inflamasoma, incluyendo niveles elevados de glucosa [58], el

exceso de lípidos como el palmitato [59] y la ceramida [60], cristales de colesterol [61], polipéptido amiloide insular (IAPP) [62], ATP [63] y especies reactivas de oxígeno (Fig. 6) [58]. Así, se ha aceptado que la inflamación es un factor importante en distintas enfermedades aparentemente no relacionadas, como gota, obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis, cáncer y la enfermedad de Alzheimer, entre otras. Dado que el inflamasoma de NALP3 se activa en estas patologías se le ha postulado como un sensor de estrés metabólico.

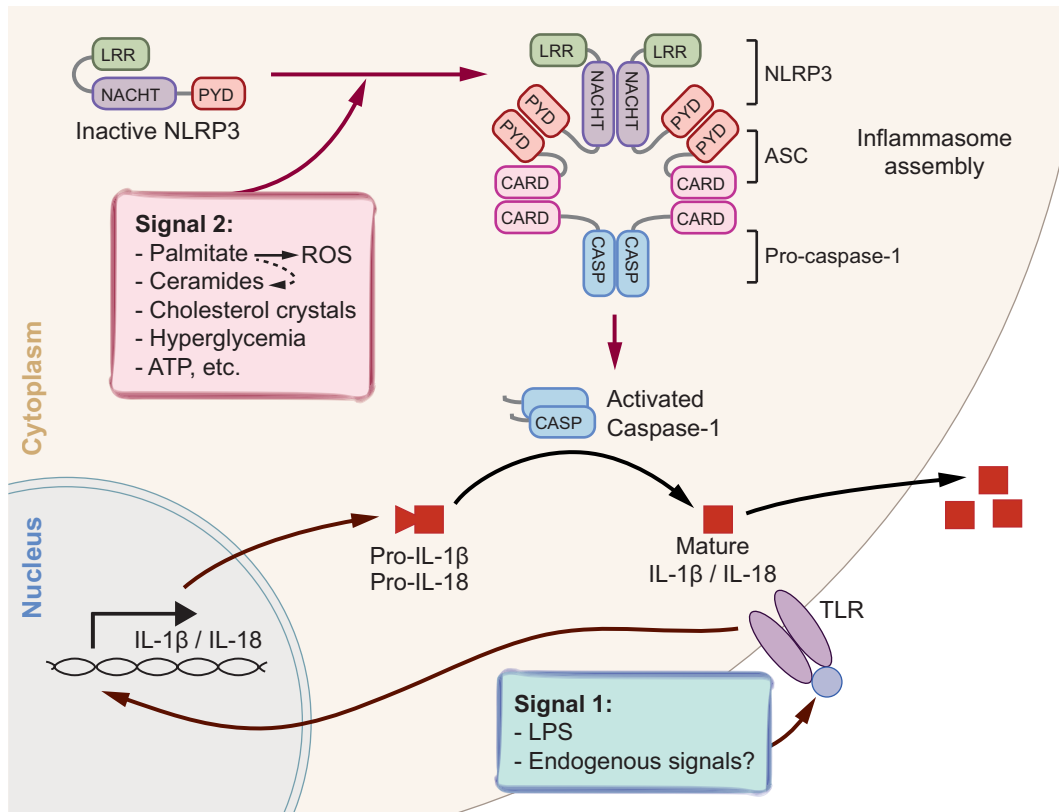


Figura 6. Modelo de activación del inflamasoma NALP3 [57].

1.8.2 Papel patológico de IL-1 β e IL-18 durante el desarrollo de obesidad y diabetes

Evidencia clínica y experimental han relacionado a citocinas como IL-1 β e IL-18 con el desarrollo de patologías y complicaciones metabólicas [64, 65].

Las acciones proinflamatorias de IL-1 β se relacionan con el desarrollo de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Mientras que IL-1 β tiene un efecto tóxico en las células β pancreáticas en el proceso de diabetes autoinmune, también esta involucrada en

el deterioro relacionado con la glucotoxicidad de la diabetes tipo 2 [66]. Estos dos procesos provocan la deficiencia en la producción de la insulina.

Por otra parte se ha demostrado que en individuos obesos hay un incremento en la expresión de IL-18 en tejido adiposo y se reportó que la secreción en adipocitos es tres veces mayor comparado con los controles [67]. Paradójicamente, ratones genéticamente modificados deficientes de IL-18, desarrollan hiperfagia, obesidad y resistencia a insulina, los cuales pueden ser revertidos mediante la administración de IL-18 recombinante [65]. Sin embargo los mecanismos moleculares que controlan la producción de IL-1 β e IL-18 durante el desarrollo de la obesidad y la resistencia a insulina no se conocen detalladamente.

1.8.3 NALP 1

Además del inflamasoma NALP3, otro receptor que ha sido estudiado es NALP1, el cual fue el primer inflamasoma en ser descrito [53] y estudios relacionados con este receptor son antecedentes para este proyecto.

NALP1 no ha sido investigado en el contexto metabólico, se ha descrito que polimorfismos en este receptor están asociados con enfermedades como Addison, vitíligo, vitíligo asociado a diabetes tipo I, artritis reumatoide y la enfermedad de Alzheimer [68-70]. Se ha propuesto que reconoce muramil dipeptido y fragmentos de peptidoglicano bacteriano, aunque no existe evidencia que se unan directamente [71].

La estructura de la proteína NALP1 humana, contiene un dominio carboxilo terminal CARD y un dominio amino-terminal PYD, un dominio central NACHT, LRR y FIIND (function-to-find) [72]. Recientemente se demostró que existe similitud entre el dominio FIIND y el dominio ZU5-UPA encontrado en proteínas autoproteolíticas PIDD (proteína con dominio de muerte) [73]. NALP1 difiere de las demás proteínas NLR por que tiene dos dominios de transducción de señales, un dominio de PYD y CARD. Se ha analizado que NALP1 humano se expresa en granulocitos, monocitos, células dendríticas, células B , células T, en neuronas y epitelio glandular como: estómago, intestino, pulmón, testículos [74].

A diferencia del gen NALP1 humano, el gen murino tiene tres genes ortólogos (NALP1 a, b y c) que son altamente polimórficos entre las cepas de los ratones. Existen 5 alelos específicos para cada cepa murina del gen NALP1b y estas variaciones genéticas han permitido identificar a NALP1b como un detector de toxina letal del ántrax.

La variación del locus entre las cepas de los ratones ha sido adjudicado a la susceptibilidad de toxina letal de bacillus antracis, los macrófagos susceptibles y no los susceptibles, dependiendo de determinada cepa, pueden activar caspasa-1 después de la exposición a la toxina. Mediante una aproximación genética se determinó por que los macrófagos de distintas cepas mueren rápidamente mientras que otras no. Se detectó que los macrófagos que morían expresaban los alelos susceptibles 1 o 5 y presentaban un tipo de muerte celular dependiente de caspasa-1 conocida como piroptosis; Mientras que los macrófagos que sobrevivían expresaban los alelos 2, 3 o 4.

Las cepas como balb/c o 129Sv con macrófagos susceptibles a la toxina del ántrax acarrean el alelo 1 de NALP1b, el cual codifica una proteína de 1,233 aminoácidos. Mientras que las cepas con macrófagos resistentes poseen alelos 2, 3 o 4. Solo la cepa CAST/EiJ es susceptible a la toxina y no acarrea el alelo 1, en lugar de este posee el alelo 5. (Fig. 7) La expresión del alelo NALP1b1 funcional en los macrófagos induce la susceptibilidad a las toxina letal del ántrax, esto se basa en las siguientes observaciones: La susceptibilidad es dominante en los ratones F1 que acarrean el alelo 1. Los alelos resistentes Nalp1b son relativamente polimórficos con respecto a los alelos susceptibles. El alelo 4 codifica presumiblemente una proteínas truncada, por lo tanto, la expresión de un alelo Nalp1b1 en macrófagos resistentes debe hacerlos susceptibles [75].

A pesar de que existen pocos estudios sobre las diferencias entre los alelos de NALP1b, se han confirmado en líneas celulares como fibroblastos que el alelo 1 NALP1 se activa por la toxina letal del ántrax pero no el alelo 3, por lo cual existe una diferencia funcional entre proteínas [72]. Por otra parte se ha identificado que NALP1b1 se activa mediante una escisión en el dominio FIIND en un motivo conservado SF/S generando dos fragmentos que permanecen asociados, facilitando el reclutamiento de pro-caspasa-1 [76].

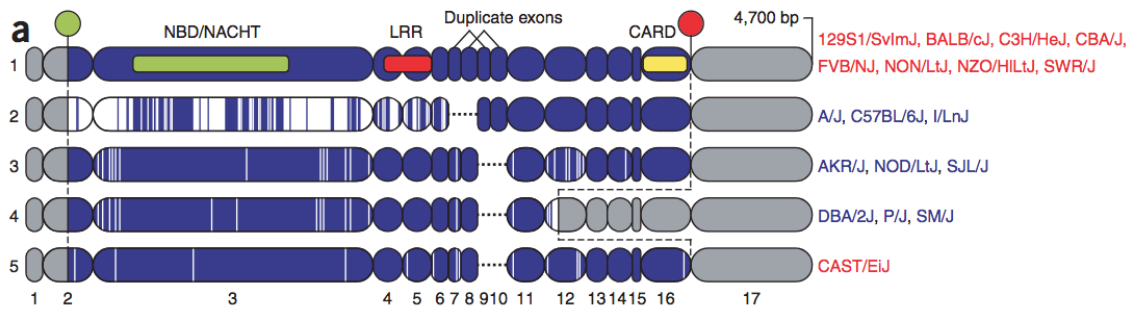


Figura 7. Alelos de NALP1b [75].

NALP1b tiene 5 alelos altamente polimórficos. Los óvalos representan los exones. Las áreas azules representan los marcos abiertos de lectura. El círculo verde: codón de inicio. El círculo rojo: codón de paro. Las áreas grises las regiones sin transcribir. Las áreas blancas representan los polimorfismos con respecto al alelo 1. Las cepas susceptibles a la toxina letal de ántrax están representadas con rojo. Las cepas resistentes a la toxina letal de ántrax están representadas con azul[75].

2 ANTECEDENTES

La obesidad es un problema de salud pública mundial; más de la mitad (50.3%) de población adulta registrada en el reporte de salud realizado por la OECD, indica que padecen de sobrepeso u obesidad. En particular en nuestro país la situación es alarmante, pues más del 69% de mexicanos adultos tiene exceso de peso corporal[17]. La obesidad resulta del desbalance entre el consumo y gasto de energía. Las alteraciones metabólicas presentes en varios órganos (páncreas, tejido adiposo, hígado, músculo cardíaco y tejido muscular) de individuos obesos resulta en el desarrollo de diabetes[1].

Recientemente se ha demostrado que la inflamación crónica (metainflamación) es crucial en la patogénesis de la obesidad. La inflamación es promovida por la expansión patológica del tejido adiposo [23]. Este crecimiento induce una alta infiltración de macrófagos [22], los cuales secretan citocinas inflamatorias como IL-1 β and IL-18 que contribuyen a la resistencia insulina y desarrollo de diabetes. El procesamiento de las citocinas de la familia IL-1 como IL-1 β e IL-18, es mediada por la cisteína proteasa caspasa-1, la cual es activada por el complejo multiprotéico conocido como inflammasoma [77].

Diversos estudios demuestran que los ratones deficientes en componentes del inflammasoma como Nlrp3^{-/-}, ASC^{-/-}, y Casp1^{-/-} tienen un menor desarrollo de ganancia de peso, hipertrofia de adipocitos, hiperinsulinemia e hiperresistinemia[78]. Los ratones Casp1^{-/-} tienen una mayor sensibilidad a insulina, además tienen un menor flujo de macrófagos en el tejido adiposo cuando son alimentados con una dieta alta en grasa que los animales silvestres. En cambio los ratones deficientes para ASC o Nlrp3 presentan menores niveles de hepatoesteatosis[60].

Estos datos concuerdan con el hecho de que distintos estudios demuestran que ácidos grasos provocan la activación del inflammasoma NALP3 y liberación de IL-1 β . En macrófagos el palmitato activa a NALP3 a través de un mecanismo que

involucra una autofagia deficiente y la acumulación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno[59]. Otro lípido que es detectado directamente por el inflammasoma NALP3 en macrófagos, es la ceramida, la cual induce inflamación durante la obesidad [79]. Lo anterior está en total concordancia con el hecho de que el desarrollo de la resistencia a insulina y la diabetes tipo II se ha asociado al incremento de lípidos inducido por exceso de nutrientes.

De acuerdo con esta idea, se ha observado que animales carentes del inflammasoma de NALP3 son más resistentes a desarrollar alteraciones en el metabolismo de glucosa inducidas por la obesidad, lo que correlaciona con una disminución en la activación de caspasa-1 en el tejido adiposo.

Se ha demostrado un papel específico de NALP3 en el daño al páncreas inducido por la obesidad crónica. El knockout para NALP3 favorece la señalización de insulina en ratones que son mantenidos en una dieta alta en grasa durante 3, 6 y 9 meses de edad. Los ratones NALP3 $-/-$ obesos de 9 meses de edad presentan significativamente menores valores de glucosa en sangre en respuesta a una prueba de tolerancia de glucosa[60]. Sin embargo, la ausencia de NALP3 reduce pero no elimina la activación de caspasa-1 en tejido adiposo visceral e hígado, lo cual sugiere que otros inflammasomas podrían contribuir a la patofisiología de la obesidad [60]. Además estudios recientes han comprobado que el desarrollo de obesidad induce un aumento en la expresión de otros inflammasomas como NALP4 y NALP1 en tejido adiposo [80].

Por otra parte se ha observado que distintas cepas de ratones muestran diferencias en la susceptibilidad a desarrollar alteraciones en el metabolismo de glucosa inducidas por la obesidad [81, 82]. Esto correlaciona con la expresión de distintos alelos del gen *nalp1b*, por ejemplo los ratones de la cepa C57BL/6 que expresan el alelo NALP1b2, son susceptibles a desarrollar tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en respuesta a una dieta hipercalórica, en cambio los animales de la cepa Balb/c, 129sv, C3H que expresan el alelo NALP1b1 son resistentes a desarrollar diabetes [83]. NALP1 fue el primer inflammasoma en ser descrito y se ha reportado que polimorfismos en este receptor están asociados

con enfermedades como Addison y vitíligo [84]. Sin embargo su papel en la inflamación en el contexto metabólico no se ha estudiado. Por tanto planteamos que el inflamasoma de NALP1b1 podría modular negativamente el proceso de inflamación inducido por la obesidad.

3 HIPÓTESIS

La proteína NALP1b1 regula negativamente el proceso inflamatorio inducido por la obesidad.

4 OBJETIVOS

General

Demostrar que NALP1b1 regula negativamente el proceso inflamatorio inducido por la obesidad.

Particulares

- Evaluar el efecto del alelo NALP1b1 en el desarrollo de la obesidad inducida por una dieta alta en grasa.
- Determinar si NALP1b1 regula las alteraciones en el metabolismo de la glucosa (tolerancia a la glucosa y resistencia a insulina) resultantes de la obesidad.
- Determinar si NALP1b1 regula el proceso inflamatorio inducido por la obesidad.

5 METODOLOGIA

5.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J y ratones C57BL/6J transgénicos los cuales expresaban el alelo NALP1b1. Los ratones transgénicos fueron donados por el Dr. Cory Teuscher de Immunobiology Division, Departamento de Medicina, Universidad de Vermont. Estos ratones transgénicos fueron generados inyectando un BAC derivado de la cepa 129 S1/SvIMJ (CT7-336A14) en oocitos fecundados de la cruce F2 C57BL/6J X SJL.[75]

5.2 Genotipificación

5.2.1 Extracción de DNA genómico

El DNA se obtuvo de biopsias de la cola de los ratones. Para la extracción de DNA se utilizó el kit Stratagene # 200600-14. A las muestras se les adicionó 500 µL de dodecilsulfato de sodio 1-5 % y 0.8 mg/mL de proteinasa K para posteriormente incubarlos a 56°C en baño maría toda la noche. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 5 min. Posteriormente se les adicionó cloruro de sodio 3.6 M, se mezclaron por inversión y se mantuvieron 15 min en hielo. Se centrifugaron 30 min a 13,000 rpm, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se adicionaron 20 µg/mL de RNasa y se incubaron 30 min a 37°C. El volumen se ajustó a 1.5 mL con etanol 100% y se mezclaron por inversión. Después se incubaron 30 min a -20°C. Las muestras se centrifugaron 30 min a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionó 200 µL de etanol 70%. Se centrifugaron 2 min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en TE 10:1 pH 8 (Tris 10mM, EDTA 1mM). Finalmente se cuantificó la concentración de DNA (µg/mL) utilizando un espectofotómetro NanoDrop.

5.2.2 Reacción de PCR

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Veriti® (Life technologies) y se utilizó una mezcla de reacción de 20 µL que contenía amortiguador de PCR (KCl 500mM, Tris-HCl pH 8.3 100mM, gelatina 10 µg/ml, 1% Tritón, 1.5 mg/mL BSA), Cloruro de Magnesio 30 mM, dNTPs 10mM, Oligonucleotido 5' 0.625 pmol, Oligonucleotido 3' 0.625 pmol, 2.5 U amplificasa ® y 100 ng DNA.

Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar NALP1b fueron utilizados son las siguientes:

Oligonucleotido F: 5'-CACACCTACAGAAAAACAAGATGATG-3

Oligonucleotido R: 5'-CATTTTCAGTAAATTCATCTTAGACCAC-3

El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C de un min, alineamiento a 56 °C por un min y extensión a 72°C por un min y un paso de extensión final a 72°C por 10 min.

5.2.3 Electroforesis de DNA en gel de Poliacrilamida 10%

El DNA se separo un geles de acrilamida al 10% utilizando TAE (Tris acetato 40mM, 2mM EDTA), a las muestras se les agregó 3 µL de buffer de carga 6X (glicerol 30%, azul bromofenol 0.25%, azul de xilencianol 0.25%). Se cargaron 8 µL de muestra en cada pozo y se corrieron a 90 volts por aproximadamente 75 min. En las reacciones de PCR utilizando el DNA de los animales transgénicos positivos se obtiene una banda de aproximadamente 150 pb, la cual es producto de la amplificación del promotor de NALP1b del transgen proveniente de la cepa 129 sv.

5.3 Condiciones de alimentación: tiempo y tipo de dieta

Se formaron 8 grupos de 6 ratones machos C57/Bl6. Cuatro de estos grupos estuvieron formados por ratones silvestres y cuatro por ratones transgénicos. Dos grupos de animales silvestres y dos de animales transgénicos se alimentaron con una dieta normal (2018SX; Harlan Teklad Global) y los otros dos grupos de ratones silvestres y de ratones transgénicos con una dieta alta en grasa (D12492; Research diets, tabla I) durante 3 o 6 meses, (fig. 8). Se registró el consumo de comida y el peso de los animales de los distintos grupos durante 12 o 24, semanas.

Tabla I Aporte calórico de las dietas

Dieta	Normal	Alta en grasa
	% Kcal	%Kcal
Proteína	24	20
Carbohidratos	58	20
Grasa	18	60

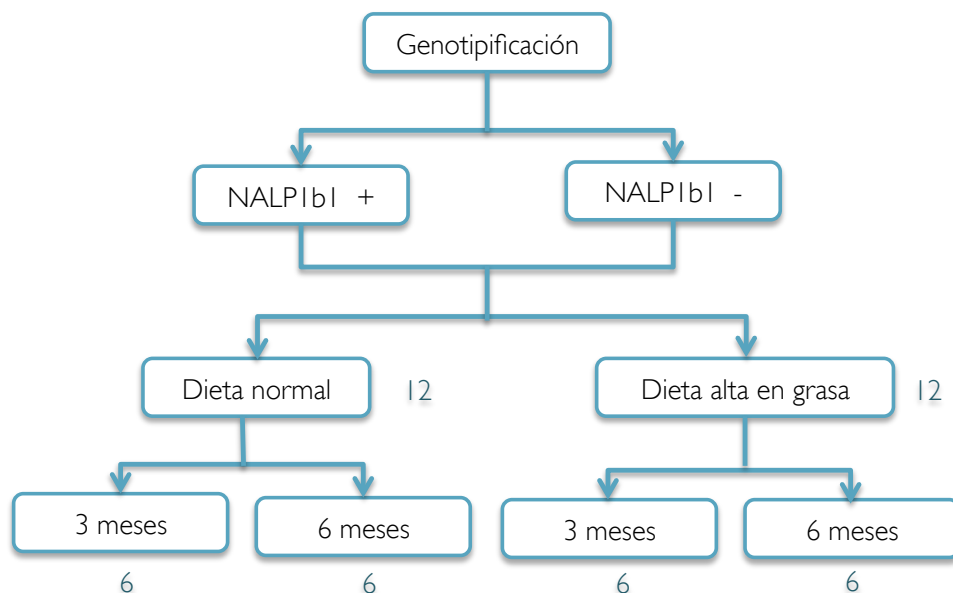


Figura 8. Diseño experimental de las condiciones para cada grupo.

5.4 Prueba de resistencia a insulina

A los ratones con 6 meses de dieta normal o alta en grasa se les realizó la prueba de resistencia a insulina. Cuatro horas antes de la prueba se retiró el alimento y 10 min previos a la prueba los animales se mantuvieron bajo una lámpara para favorecer la vasodilatación. A cada ratón se le administró 2 mU de insulina Humulin-R ® por g de peso por vía intraperitoneal. A los 0, 15, 30, 60 y 120 min, después de la inyección se midió la concentración de glucosa en sangre utilizando un glucómetro Accu-Chek Active®.

5.5 Prueba de tolerancia a glucosa

A los ratones con 3 y 6 meses de dieta normal o alta en grasa se les realizó la prueba de tolerancia a glucosa. Antes de la prueba se les restringió el alimento durante 4 hrs. Se mantuvieron 10 min previos a la prueba bajo una lámpara para favorecer la vasodilatación. A cada ratón se le administró 1.8 mg de D-glucosa por g de peso por vía intraperitoneal. Se midió la concentración de glucosa de sangre obtenida de la cola a los 0, 15, 30, 60 y 120 min, después de la inyección utilizando un glucómetro Accu-Chek Active®.

5.6 Sacrificio de los ratones

Al concluir el término de la dieta y las pruebas respectivas se sacrificaron a los ratones a las 9:00 a.m. Para los experimentos donde se evaluó la activación de la vía de señalización de insulina se inyectaron intraperitonealmente 2 ratones de cada grupo experimental con 2mU de insulina Humulin-R ® por g de peso. Los animales se sacrificaron a los 5 minutos por dislocación cervical después de la inyección. Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardiaca, la sangre fue colocada en tubos eppendorf. Después se realizó la disección de los siguientes órganos: tejido adiposo, hígado, músculo y páncreas. Se fijó el tejido adiposo (mesentérico), hígado y páncreas en paraformaldehído al 4%. Parte del tejido adiposo (mesentérico), hígado y el músculo se ultracongeló a -70°C.

5.6.1 Obtención de suero

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardiaca se mantuvieron a temperatura ambiente aproximadamente dos horas para favorecer la formación de coágulo. Se centrifugaron a 1,200 rpm durante 10 min, se colectó el sobrenadante (suero) y se conservaron a -20°C.

5.7 Extractos Proteicos

Se descongeló el tejido hepático y se agregó a las muestras entre 400-600 μ L del buffer de lisis (Tris 20 mM pH7.4, NaCl 137 mM, 25 mM β -glicerolfosfato pH 7.4, 2mM PPI_{Na}, 2 mM EDTA pH 7.4, Triton X-100 1%, Glicerol 10%) suplementado con inhibidores proteasas y fosfatasas (Aproptinina 10 μ g/mL, Pestatina 10 μ g/mL, Leupeptina 10 μ g/mL, Antipirina 10 μ g/mL, Na₃VO₄ 200 mM, DTT 0.1mM, PMSF 1mM). El tejido se sonicó entre 10-20 min. tiempo en el que el tejido se homogeniza completamente, el homogenizado se incubó en hielo durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 14,500 rpm a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y se conservaron a -70°C.

El tejido adiposo congelado se colocó en un mortero con nitrógeno líquido y se maceró. Los macerados se colectaron en tubos eppendorf y se les agregó entre 400-600 de buffer de lisis (Aproptinina 10 μ g/mL, Pestatina 10 μ g/mL, Leupeptina 10 μ g/mL, Antipirina 10 μ g/mL, Na₃VO₄ 200 mM, DTT 0.1mM, PMSF 1mM). Las muestras se incubaron 10 min en hielo y se centrifugaron a 14,500 rpm a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se ultracongeló a -70°C.

5.8 Inmunoblott

Las proteínas de los extractos totales se cuantificaron mediante la técnica de Bradford. 40 mg de proteína se resolvieron en geles de acrilamida al 10% en buffer de corrida (Tris 25mM, glicina 200mM, SDS) a 40mA por 1 hr. La proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.20 μ m), a 100 Volts durante 90 minutos en buffer de transferencia (Tris 25mM, glicina 200mM y metanol 20%).

Se analizó la calidad de la transferencia tiñendo la membrana con rojo de ponceau y se lavó con agua destilada. La membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T (Tris 20mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0.05%). Se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario disuelto en leche o en albúmina sérica bovina al 5 %. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T. Se incubó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidada durante una hora a temperatura ambiente en leche al 5 % en TBS-T o BSA al 5 % en TBS-T. Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T. Los complejos inmunes se revelaron mediante quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados anti-AKT fosforilado (ser 473;9271) y anti-AKT (no. 9272) se obtuvieron de Cell Signaling; el anticuerpo anti-caspasa-1 (sc-514) y anti-IL-1 β (sc-1251) se obtuvieron de Santa cruz Biotchnology; el anticuerpo anti-Tubulin (9026) fue de Sigma.

5.9 ELISA

Se realizó un ensayo inmunoenzimático utilizando el Kit 900-K47 de Peprotech. A cada pozo de una placa para ELISA se agregaron 100 μ L de anticuerpo de captura (anti-IL-1 β , 2 μ g/mL) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se aspiraron los pozos para remover el líquido y se adicionó 300 μ L del buffer de lavado (PBS – tween 0.05%) en cada pozo, se invirtió la placa sobre una toalla de papel para quitar el buffer residual, estos lavados se realizaron 4 veces.

Se adicionó 300 μ L de buffer de bloqueo (PBS- BSA 1%) a cada pozo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se aspiraron los pozos y se lavaron 4 veces con buffer de lavado.

Se realizó una curva estándar de 31.25 pg/mL a 4000 pg/mL , partiendo de una concentración de 4ng/mL, la cual se diluyó de forma serial siete veces. Se agregaron 100 μ L de las muestras estándar o de los sueros murinos y la placa se incubó durante 2 horas.

Se aspiraron las muestras y los pozos se lavaron 4 veces, después de los cual se cargaron 100 μ L del anticuerpo de detección acoplado a biotina (0.5 μ g/mL) y se

incubó durante 2 horas. Los pozos se lavaron cuatro veces como se describió arriba.

Se añadieron 100 μ L del conjugado de avidina-HRP 1:2000 y se incubó 30 minutos. Al cabo de este tiempo los pozos se lavaron cuatro veces y se adicionaron 100 μ L del sustrato ABTS en cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente y se determinó en un espectrofotómetro (Molecular Devices Emax Microplate Reader) la densidad óptica a 450 nm.

5.10 Niveles de insulina y lípidos en suero

Las muestras de suero se analizaron en Laboratorios Guillen® Cuernavaca, Morelos.

5.10.1 Ensayo de quimioluminiscencia

Los niveles de insulina se midieron mediante un ensayo inmunométrico utilizando unidades de análisis recubiertas con anticuerpos murinos anti-insulina acoplados con fosfatasa alcalina. Los valores de insulina fueron registrados en un sistema de inmunoensayo IMMULITE/IMMULITE 1000.

5.10.2 Perfil lipídico

Los niveles de triglicéridos y colesterol se midieron a través de la formación del colorante quinoneíma y de LDL a través de la formación de un colorante quinona, los valores se registraron mediante un analizador de químicos automatizado COBAS Mira de Roche diagnostics a 520 nm (triglicéridos), 505 nm (colesterol) y 600 nm (LDL).

5.11 Cálculo del área bajo la curva (ABC)

5.11.1 ABC - Tolerancia a glucosa

El área bajo la curva para la prueba de tolerancia a glucosa se calculó por ratón con la siguiente fórmula:

$$\sum_{n=1}^{x-1} \left((T_{n+1} - T_n) \times \left(\frac{|Glu_{T_n} - Glu_{T_{n+1}}|}{2} + \min(Glu_{T_n}, Glu_{T_{n+1}}) - Glu_{T_0} \right) \right)$$

Donde Glu es la concentración de glucosa, T es el tiempo, n tiempo en que se registro los niveles de glucosa, x es el total de tiempos de registros y $\min(Glu_{T_n}, Glu_{T_{n+1}})$ es la concentración de glucosa más baja entre dos tiempos consecutivos.

5.11.2 ABC – Resistencia a insulina

El área bajo la curva para la prueba de resistencia a insulina se calculó por ratón considerando el decremento de la glucosa entre el tiempo T_0 y T_{15} , utilizando los valores absolutos de glucosa. El cálculo es el área inversa de la curva (AUCi) debajo de los valores basales. La fórmula es la siguiente:

$$\sum_{n=1}^{x-1} \left((T_{n+1} - T_n) \times \left(\frac{|Glu_{T_n} - Glu_{T_{n+1}}|}{2} + Glu_{T_0} - \max(Glu_{T_n}, Glu_{T_{n+1}}) \right) \right)$$

Donde Glu es la concentración de glucosa, T es el tiempo, n tiempo en que se registro los niveles de glucosa, x es el total de tiempos de registros y $\max(Glu_{T_n}, Glu_{T_{n+1}})$ es la concentración de glucosa más alta entre dos tiempos consecutivos. [85]

5.12 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar de la media. Los datos fueron sometidos a pruebas de T de Student utilizando el programa Prism 5, se determinó que las diferencias entre los datos comparados son significativas cuando muestran una p de <0.05 .

6 RESULTADOS

6.1 Inducción de obesidad por una DAG

Como ya se mencionó anteriormente, la inflamación iniciada por la activación del inflammasoma en respuesta a alteraciones metabólicas juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades asociadas al síndrome metabólico como la obesidad, diabetes [78] y aterosclerosis [86]. Se ha observado que animales carentes del inflammasoma de NALP3 son más resistentes a desarrollar alteraciones en el metabolismo de glucosa inducida por obesidad, lo que correlaciona con una disminución en la activación de caspasa-1 en el tejido adiposo. Aunque reducida, estos animales aun presentan activación de caspasa-1 en tejidos afectados por alteraciones metabólicas [60]. Estas evidencias sugieren la participación de otros inflammasomas además de NALP3, durante el desarrollo de obesidad y diabetes.

Por otra parte, la expresión de distintos alelos del gen *nalp1b* correlaciona con la predisposición a desarrollar diabetes en respuesta a una dieta hipercalórica. Se ha documentado que los ratones C57BL/6 que expresan el alelo NALP1b2, son vulnerables a desarrollar diabetes en respuesta a una DAG, en cambio los animales de la cepa Balb/c, que expresan el alelo NALP1b1 son resistentes a presentar diabetes [82].

Para probar si el alelo *Nalp1b1* modula la respuesta inflamatoria inducida por obesidad, sometimos ratones machos C57B6/J silvestres y transgénicos que expresan NALP1b1 a una dieta alta en grasa (DAG) durante 3 meses. Los ratones destinados como grupos control, a los cuales se les administró una DN, no presentaron una diferencia en relación al peso registrado al inicio del experimento (2 meses de edad). Los ratones con DN silvestres pesaron en promedio 21.22 ± 0.63 y el grupo de ratones transgénicos pesaron 21.23 ± 1.34 . De igual forma, a los 5 meses de edad no se determinó una diferencia en cuanto a la ganancia de peso comparando los genotipos.

En cambio los grupos destinados para la administración de una DAG durante 3 meses, presentaron una diferencia en relación al peso a los 2 meses de edad. Los ratones silvestres (21.10 ± 0.52) pesaban menos que los ratones transgénicos (23.05 ± 0.62) ($P < 0.05$). Sin embargo la diferencia del peso a los 3 meses de consumir una DAG entre ratones silvestres (22.37 ± 2.99) y transgénicos (26.13 ± 0.62) no fue significativa, por lo tanto se descartó la posibilidad de que la diferencia en los pesos antes de la administración de la dieta, influyera en la comparación de los parámetros que indican alteraciones en la homeostasis de la glucosa.

Los animales alimentados con DAG tuvieron mayor ganancia de peso (Fig.9A) que los ratones silvestres y transgénicos ($n=6$) alimentados con una dieta normal (DN), esta diferencia de peso fue significativa desde la primera semana. Lo que correlacionó con que los animales alimentados con la DAG consumieron un número mayor de calorías por día que los alimentados con la DN (Fig.9B), a pesar de que consumen una cantidad menor de alimento que los animales alimentados con la DN (Fig.9C)

A los 6 meses de ser alimentados con la DAG tanto los ratones silvestres y transgénicos tuvieron una mayor ganancia de peso que los ratones silvestres y transgénicos alimentados con la DN (Fig.9D). Esta diferencia fue estadísticamente significativa desde la quinta semana. De igual manera los animales alimentados con la DAG durante 6 meses consumieron menos comida comparado con los alimentados con la DN (Fig.9E) pero tuvieron un mayor consumo calórico (Fig.9F). Por otra parte, no se observaron diferencias en el consumo calórico entre los animales silvestres y transgénicos independientemente de la dieta o el tiempo (Fig.9 C y F). La ganancia de peso de los ratones silvestres con DN o DAG no fue significativamente diferente cuando se compara con la de los transgénicos (Fig. 9 A y D).

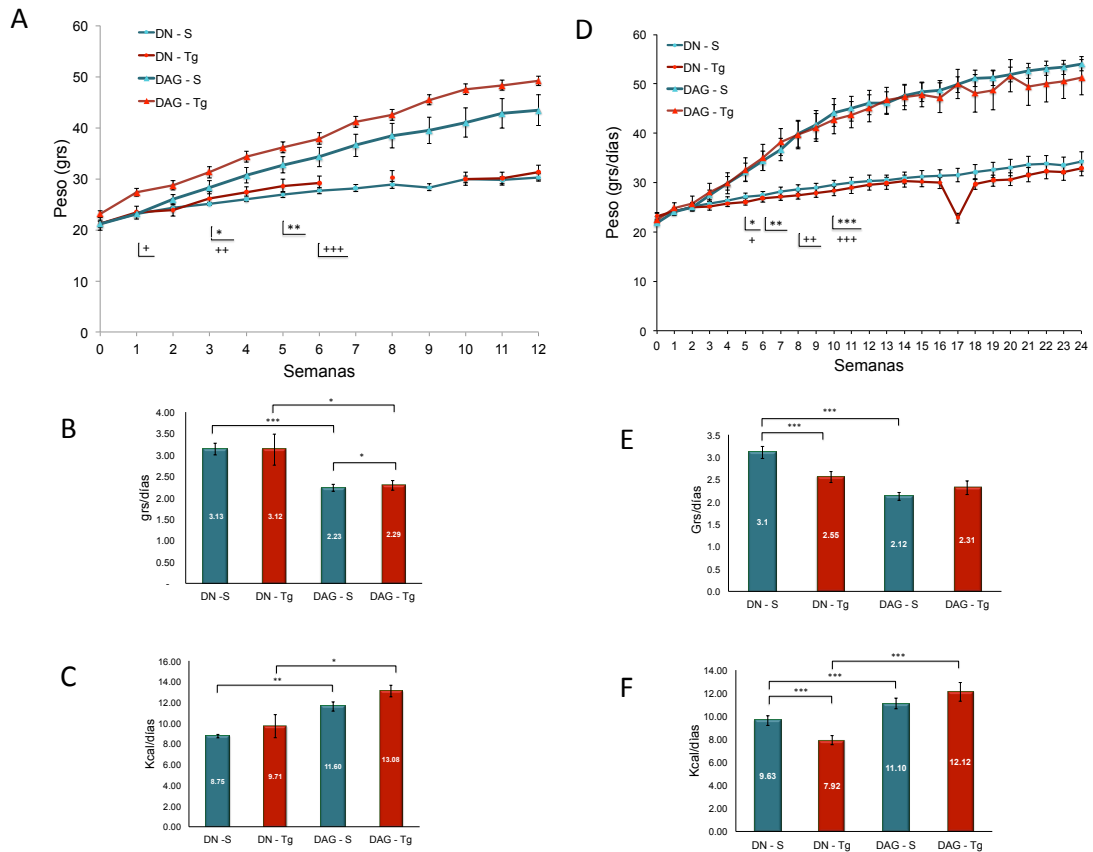


Figura 9. Ratones silvestres y transgénicos tienen mayor ganancia de peso sometidos a una DAG. A) Ganancia de peso en ratones machos C57BL/6 (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos (Silvestres) y cruces (transgénicos) representan las diferencias significativas entre los grupos con DN y DAG. *,+p < 0.05; **,++p < 0.005; ***,+++p < 0.001. B) Consumo de alimento diario (g/días) en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. *p < 0.05; ***p < 0.001. C) Consumo calórico (Kcal/días) en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. *p < 0.05; **p < 0.005. D) Ganancia de peso en ratones machos C57BL/6 (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos (Silvestres) y cruces (transgénicos) representan las diferencias significativas entre los grupos con DN y DAG. *,+p < 0.05; **,++p < 0.005; ***,+++p < 0.001. E) Consumo de alimento diario (g/días) en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. ***p < 0.001. F) Consumo calórico (Kcal/días) en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo). Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. ***p < 0.001.

Estos resultados en conjunto indican que la DAG induce obesidad y que la expresión de Nalp1b1 no modula la ingesta calórica y por tanto no previene el desarrollo de obesidad en ratones.

6.2 Nalp1b1 previene la hiperglicemia inducida por la DAG

Para determinar si NALP1b1 modula las alteraciones en el metabolismo de glucosa inducida por la DAG, medimos la concentración de glucosa basal en sangre, después de 4 horas de ayuno, tanto en animales alimentados con la DN como en los alimentados con la DAG.

De acuerdo con datos previamente publicados [87], los ratones alimentados con la DAG mostraron concentraciones mayores de glucosa basal en sangre que los ratones alimentados con la DN (Fig. 10A). Interesantemente, se detectaron menores niveles de glucosa en ratones transgénicos alimentados por tres meses con la DAG que los de los ratones silvestres alimentados con la misma dieta (Fig. 10A), de hecho los niveles de glucosa en los animales transgénicos fueron similares a los niveles de glucosa de los animales silvestres alimentados con la DN (Fig.10A). Sin embargo, estas diferencias en los niveles de glucosa basal entre animales silvestres y transgénicos alimentados con la DAG por seis meses no son significativas y por el contrario se observan concentraciones ligeramente mayores en los ratones transgénicos (Fig. 10B). De acuerdo a lo esperado la DAG indujo hiperglicemia a las 3 y 6 meses de dieta (Fig. 10B). Estos resultados sugieren que la expresión de Nalp1b1 tiene un efecto sobre los niveles de glucosa en animales alimentados por 3 meses con una DAG.

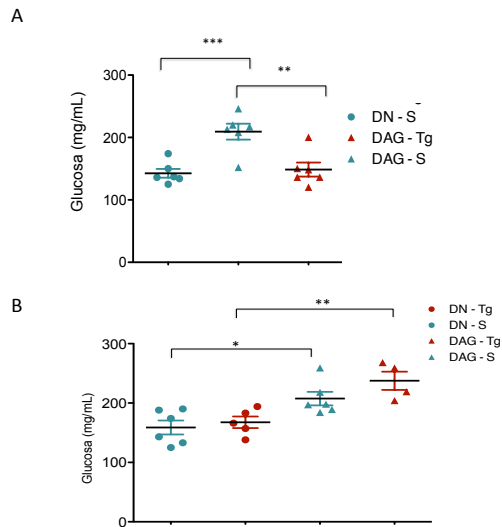


Figura 10. La expresión de Nalp1b1 modifica los niveles de glucosa basal a los 3 meses. A) Niveles de glucosa basal en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) B) Niveles de glucosa basal en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre silvestres con DN y DAG. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

6.3 NALP1b1 modifica la tolerancia glucosa y la producción de insulina en ratones obesos.

Para determinar el efecto de NALP1b1 en el control glucémico durante el desarrollo de obesidad, se les realizaron pruebas de tolerancia a glucosa (PTG). Esta prueba evalúa indirectamente la secreción de insulina, la sensibilidad a insulina y glucosa [88]. Las pruebas se realizaron en ratones alimentados con DN o DAG durante 3 o 6 meses. De acuerdo con resultados previamente publicados [89], los animales alimentados con la DAG exhibieron deficiencias en la homeostasis de la glucosa a los 3 meses y 6 meses de la administración de la dieta (Fig.11). Específicamente, a los 3 meses se observó que después de la inyección del bolo de glucosa, los ratones alimentados con la DN mostraron un incremento en los niveles de glucosa durante los primeros 15 minutos y disminuyeron con el tiempo a niveles basales (Fig.11A). En cambio, tanto los ratones silvestres como los ratones NALP1b1 alimentados con la DAG mostraron niveles elevados de glucosa durante más tiempo (Fig. 11A), sin embargo los animales NALP1b1 al cabo de 120 min prácticamente presentaron niveles basales de glucosa, en tanto que los niveles de glucosa de los animales silvestres

no regresaron a la basal y a este tiempo se encontraron significativamente elevados (Fig.11A) Otro indicador que refleja la diferencia en el cambio de los niveles de glucosa respecto al tiempo de manera cuantitativa, es el área bajo la curva (ABC). El ABC de los ratones con DN es menor que los ratones con DAG (Fig.11B), lo que indica que los ratones alimentados con la DAG son intolerantes a glucosa.

Interesantemente al comparar la respuesta de los ratones transgénicos y silvestres alimentados con la DAG, se observó que los ratones NALP1b1 disminuyen de forma más eficiente los niveles de glucosa en sangre que los ratones silvestres. (Fig.11A). Esto se reflejo en el ABC de los ratones NALP1b1 alimentados con la DAG ya que ésta es claramente menor que la de los ratones silvestres alimentados con DAG (Fig.11B). Lo cual sugiere que a pesar del desarrollo de obesidad los ratones NALP1b1 detectan mejor la glucosa en sangre y la remueven como mecanismo de homeostasis.

Estos resultados se confirmaron con un grupo independiente de animales, nuevamente los animales alimentados por 3 meses con la DN, disminuyeron los niveles de glucosa en sangre más rápido que los animales alimentados con la DAG en la PTG (Fig. 11C). Igualmente el ABC de los animales alimentado con la DN fue significativamente menor que la de los animales alimentados con la DAG (Fig. 11D). Además también se observó que los ratones NALP1b1 regulan mejor los niveles de glucosa en sangre que los animales silvestres (Fig. 11C), lo que se confirmó al determinar el ABC, éste fue menor que la de los animales silvestres (Fig. 11D y 10E). Las alteraciones en el metabolismo de glucosa inducido por la DAG en los animales silvestres correlacionaron los niveles de insulina de estos animales, ya que presentaron una reducción de prácticamente la mitad (75UI /mL) de los niveles de insulina (165 UI/mL) de los animales silvestre alimentados con la DN (Fig. 11F). Interesantemente los niveles de insulina en sangre de los animales transgénicos alimentados con la DAG fueron similares a los de los animales silvestres alimentados con la DN (Fig. 11F). Estos resultados sugieren que la expresión de NALP1b1 reduce las alteraciones en el metabolismo de glucosa resultantes de la obesidad. NALP1b1 podría atenuar la incapacidad de almacenamiento glucosa a nivel hepático o muscular, la hiperglucemia o la

resistencia insulina al regular negativamente la inflamación generada por el exceso de lípidos presentes en la obesidad, lo cuales se acumulan de forma ectópica en hígado, músculo, célula beta pancreática, induciendo un efecto lipotóxico y estrés celular.

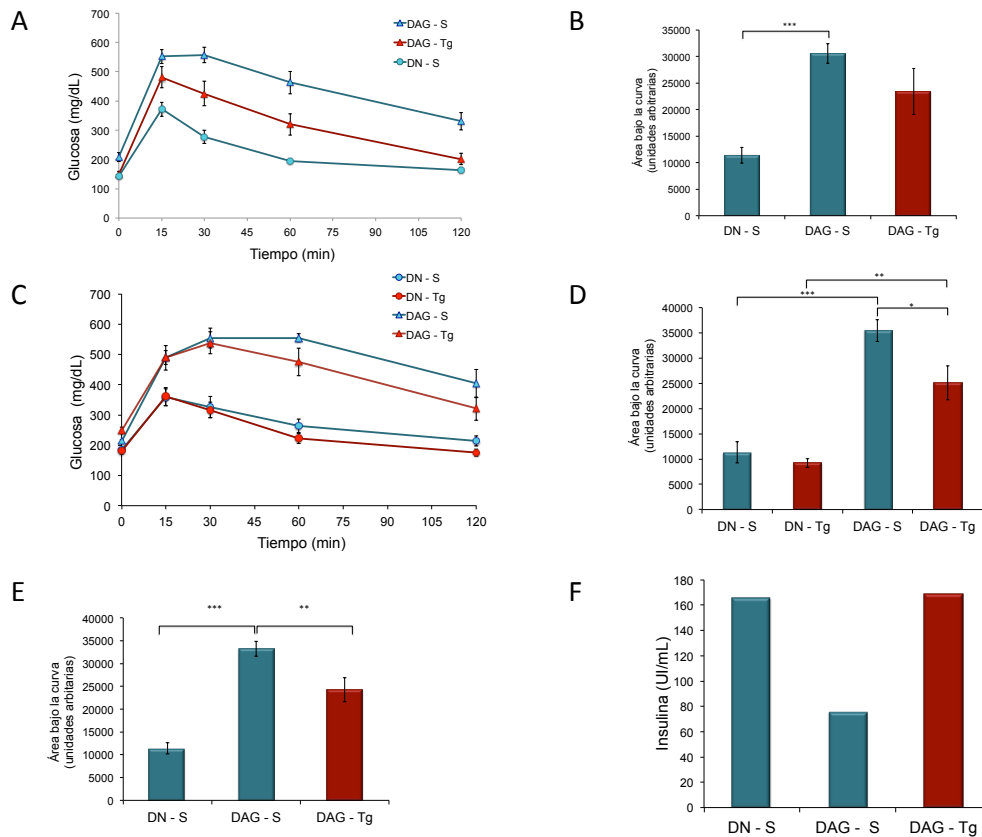


Figura 11. La expresión de Nalp1b1 favorece la sensibilidad a glucosa a los 3 meses de dieta.

A) Prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones machos C57BL/6 (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres (S) y transgénicos (Tg) alimentados con DN (DN) o DAG (DAG) durante 12 semanas (n=6 por grupo) se ayunaron por 4 hrs y se les inyectó glucosa intraperitonealmente, los niveles de glucosa en sangre se determinaron como se menciona en materiales y métodos. B) Área bajo la curva para la PTG en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos.***p < 0.001. C) Prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones machos C57BL/6J (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo) D) Área bajo la curva para la PTG en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. E) Área bajo la curva para la PTG en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=12 por grupo) Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. **p < 0.005, ***p < 0.001. F) Niveles de insulina en suero de ratones machos C57BL/6J silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 12 semanas (n=6 por grupo).

Dado que animales obesos por la ingesta prolongada de una DAG presentan inflamación crónica en el tejido adiposo y alteraciones marcadas en el metabolismo de la glucosa (intolerancia a glucosa y resistencia a insulina) [90], evaluamos si la expresión de NALP1b1 favorece la homeostasis de la glucosa en animales obesos alimentados con la DAG por 6 meses. Las PTG mostraron que tanto los ratones silvestres como los ratones NALP1b1 alimentados con la DN disminuyen los niveles de glucosa en sangre desde los 30 min y que no hay diferencia en la cinética de la disminución de los niveles de glucosa en sangre entre ellos. En cambio, los niveles de glucosa en sangre de los animales alimentados con la DAG no disminuyó en los 120 min que duró la prueba (Fig. 12A). La intolerancia a la glucosa que presentan los ratones con DAG es consistente con el ABC, la cual es menor en los ratones alimentados con DN que los ratones alimentados con DAG (Fig. 12B). Estos resultados corroboran que existe una alteración en el metabolismo de los ratones a los que se les induce obesidad mediante una DAG y que es más pronunciada cuando el periodo de dieta es mayor (Comparare Figs. 11A y 12A). Sin embargo, contrario a los resultados obtenidos con los animales Nalp1b1 alimentados con la DAG por 3 meses, la expresión de NALP1b1 no previno la intolerancia a la glucosa inducida por la DAG administrada por 6 meses, ya que las respuestas a la PTG de los ratones obesos silvestres y obesos NALP1b1 no presentaron diferencias significativas (Fig. 12A y 12B). Estos resultados indican que la expresión de NALP1b1 en ratones con 6 meses de DAG no previene el deterioro en el metabolismo de la glucosa.

Como se mencionó anteriormente, distintos estudios han mostrado que una DAG induce resistencia a insulina [90]. Para determinar si los ratones alimentados con la DAG por 6 meses desarrollaron esta condición se realizaron pruebas de resistencia a insulina. Independientemente del genotipo, los ratones alimentados con la DN o la DAG responden de forma similar a la insulina ya que no se observa una diferencia en las concentraciones de glucosa en sangre a los distintos tiempos después de la inyección de insulina (Fig. 12C). Asimismo, tampoco se

observan diferencias significativas en el área bajo la curva (Fig. 12D), lo que indica que a pesar de ser sometidos a una DAG los ratones responden igual al bolo de insulina. Sin embargo, los niveles de insulina en sangre de los ratones silvestres alimentados con DN fueron mayores (54 UI/mL) que los niveles de insulina de los ratones con alimentados con la DAG (11 UI/mL) (Fig. 12E). Es importante destacar que los valores de insulina en sangre de los animales silvestres alimentados con la DN por 6 meses fueron 3 veces menores (54 UI/mL) (Fig. 12E) que los del los animales del grupo alimentado por 3 meses con DN (165 UI/mL) (Fig. 11F). Por otra parte, los ratones NALP1b1 exhibieron mayores concentraciones de insulina preprandial en sangre a comparación de los ratones silvestres independientemente de la dieta (Fig. 12E). Estos datos indican que la expresión de NALP1b1 tiene un efecto protector en la secreción de insulina. (Fig. 12B). Probablemente uno de los factores que incrementan las deficiencias en la sensibilidad a insulina y la intolerancia a glucosa a los 6 meses de dieta sea la edad. De acuerdo con esto, al comparar las áreas bajo la curva de los ratones con DN a los 3 meses y 6 meses de dieta (Fig.12F), se observa que existe una tendencia a generar intolerancia a la glucosa cuando los ratones tienen mayor edad.

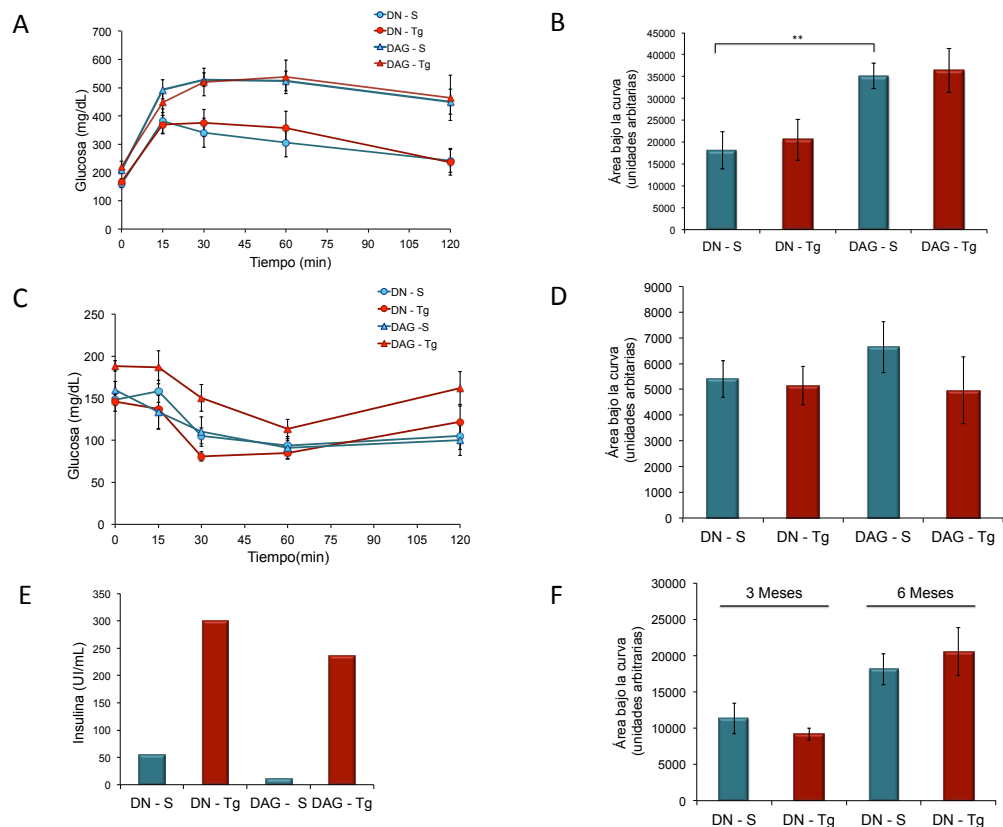


Figura 12. La presencia Nalp1b1 no favorece la sensibilidad a glucosa a los 6 meses de dieta. A) Prueba de tolerancia a glucosa en ratones machos C57BL/6 (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres (S) y transgénicos (Tg) alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo) se ayunaron por 4 hrs y se les inyectó glucosa intraperitonealmente, los niveles de glucosa en sangre se determinaron como se menciona en materiales y métodos. B) Área bajo la curva para la PTG en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas. Los datos representan la media \pm error estándar. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos. *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001. C) Prueba de resistencia a insulina en ratones machos C57BL/6 (2 meses de edad antes del tratamiento) silvestres (S) y transgénicos (Tg) alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo) se ayunaron por 4 hrs y se les inyectó insulina intraperitonealmente, los niveles de glucosa en sangre se determinaron como se menciona en materiales y métodos. D) Área bajo la curva para la PRI en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas E) Niveles de insulina en suero de ratones machos C57BL/6J silvestres y transgénicos alimentados con DN o DAG durante 24 semanas (n=6 por grupo). F) Área bajo la curva para la PTG en ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN durante 12 o 24 semanas.

6.4 NALP1b1 modula la producción de IL-1 β

Como se ha mencionado anteriormente, se ha reconocido que IL-1 β es uno de los factores más importantes en desarrollo de diabetes tipo I y II [66], además de que es un instigador de la metainflamación en el desarrollo de síndrome

metabólico [91]. Por tanto probamos si NALP1b1 juega un papel directo en la inflamación inducida por la obesidad, para esto determinamos los niveles de activación del inflamasoma y producción de IL-1 β , específicamente se detectaron por inmunoblott los niveles de pro-caspasa 1, caspasa-1 e IL-1 β madura en tejido adiposo, uno de los tejidos involucrados en la homeostasis energética.

De acuerdo con datos previamente publicados que indican que la inflamación en el tejido adiposo de animales obesos inducida por una DAG depende de la activación de caspasa-1, los fragmentos p20 y p10 de caspasa-1 se detectó en 3 de 6 ratones silvestres alimentados con la DAG por 3 meses y en 3 de 6 ratones NALP1b1 alimentados con la misma dieta (Fig.13A). Interesantemente, en la mayoría de los animales alimentados con la DAG por 3 meses los niveles de pro-caspasa-1 fueron mucho más elevados que los observados en los ratones alimentados con la DN. De acuerdo con estos datos, todos los animales silvestres alimentados durante 3 meses con la DAG presentaron niveles detectables de el fragmento de 17KDa de IL- β , el cual representa la interleucina madura (Fig. 13B).

A pesar de que no se observan diferencias evidentes en la activación de caspasa-1 entre silvestres y transgénicos, los niveles de IL-1 β madura parecen ser menores en los transgénicos ya que no en todos los animales se detectó el fragmento de 17 KDa y en aquellos animales que sí se detectó este fragmento, su intensidad fue menor que la observada en los animales silvestres (Fig. 13B). Este dato se confirmó determinando los niveles de IL-1 β en el suero. Los animales silvestres obesos presentaron una concentración mayor de IL-1 β que la detectada en el suero de animales obesos Nalp1b1 (Fig. 13C).

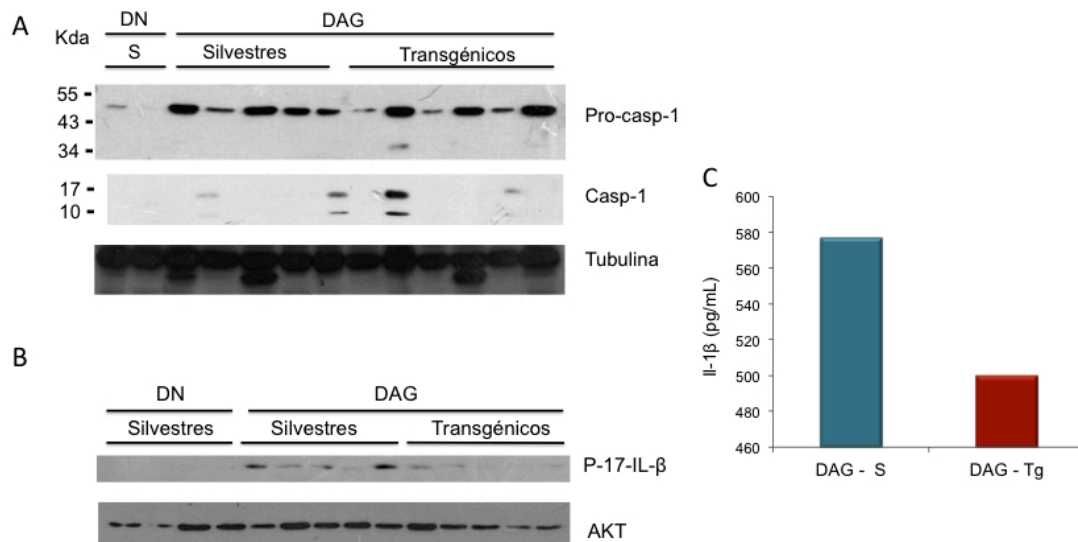


Figura 13. Nalp1b1 regula negativamente la producción de IL-1 β en animales obesos alimentados con una DAG durante 3 meses.

A) Los extractos proteicos totales (40 μ g) fueron obtenidos del tejido adiposo mesenterico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN (DN) o DAG (DAG) por 12 semanas se separaron en geles de poliacrilamida y los niveles de procaspasa-1 (pro-caspasa) y caspasa-1 activa (Caspasa) se determinaron por medio de inmunoblot usando anticuerpos específicos, como control de carga se evaluaron los niveles de Tubulina B) Los extractos proteicos totales (40 μ g) fueron obtenidos del tejido adiposo mesenterico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN (DN) o DAG (DAG) por 12 semanas se separaron en geles de poliacrilamida y los niveles de IL-1 β activa se determinaron por medio de inmunoblot usando anticuerpos específicos, como control de carga se evaluaron los niveles de AKT C) Concentración de IL-1 β en suero de ratones alimentados con una DAG durante 12 semanas (pool n=6) determinado mediante ELISA.

Asimismo en ratones con 6 meses de DAG se detectaron mayores niveles de los componentes p10 y p20 de caspasa-1 en tejido adiposo a comparación de los ratones con DN (Fig. 14A). Además se observó que la activación de caspasa-1 es mayor, comparado a los 3 meses de DAG (Fig. 13A), tanto en ratones silvestres como ratones NALP1b1 alimentados con la DAG (Fig. 14A). Esto refleja que existe un mayor grado de inflamación a este tiempo de dieta y que la activación de caspasa-1 es progresiva.

En relación a los niveles de IL-1 β madura, se determinó que su producción es mayor cuando se induce obesidad mediante la DAG (Fig. 14B). Los niveles de IL-1b (17KDa) en ratones transgénicos es ligeramente menor que la de los animales silvestres (Fig. 14B). Estos resultados concuerdan con los niveles de IL-1 β detectados en el suero de ratones transgénicos con DAG, estos exhiben una menor producción de IL-1 β (Fig. 14C). Estos experimentos sugieren que la

expresión de NALP1b1 podría regular negativamente la inflamación provocada por obesidad en tejido adiposo.

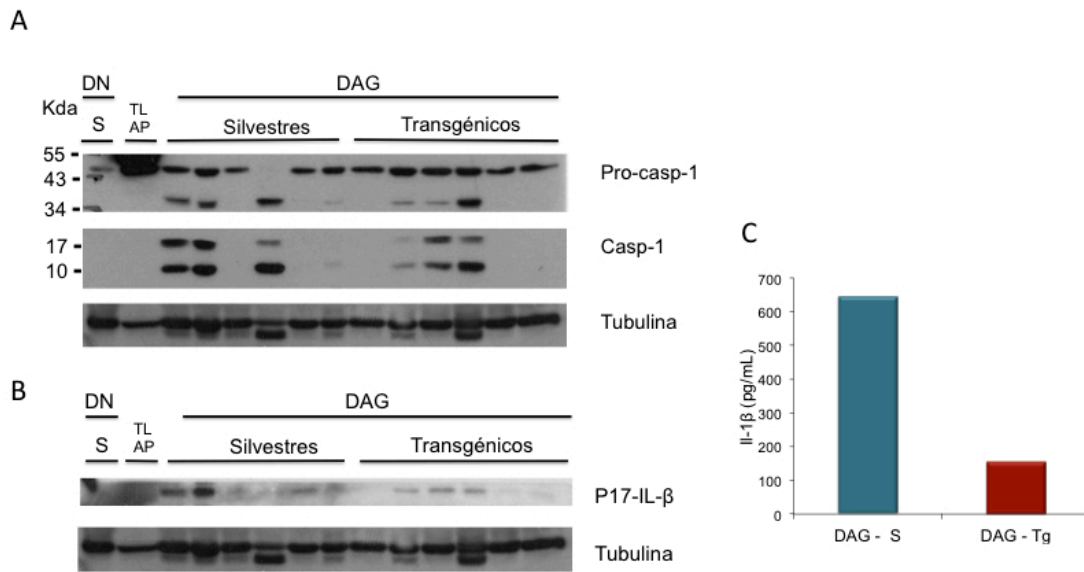


Figura 14. Nalp1b1 regula negativamente la producción de IL-1 β en animales obesos alimentados con una DAG durante 6 meses. A) Los extractos proteicos totales (40 ugr) fueron obtenidos del tejido adiposo mesentérico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN (DN) o DAG (DAG) por 24 semanas, se separaron en geles de poliacrilamida y los niveles de procaspasa-1 (pro-caspasa) y caspasa-1 activa (Caspasa) se determinaron por medio de inmunoblot usando anticuerpos específicos, como control de carga se evaluaron los niveles de Tubulina B) Los extractos proteicos totales (40 ugr) fueron obtenidos del tejido adiposo mesentérico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN (DN) o DAG (DAG) por 24 semanas se separaron en geles de poliacrilamida y los niveles de IL-1 β activa se determinaron por medio de inmunoblot usando anticuerpos específicos, como control de carga se evaluaron los niveles de tubulina C) Concentración de IL-1 β en suero de ratones alimentados con una DAG durante 24 semanas (pool n=6) determinado mediante ELISA.

6.5 NALP1b1 no altera la resistencia a insulina en ratones con obesidad

Se sabe que el desarrollo del síndrome metabólico y la metainflamación generada por esta patología, genera la producción de citocinas pro-inflamatorias que favorecen la aparición de resistencia a insulina, así como alteraciones en la secreción de esta hormona [92]. Debido a que los efectos metabólicos de insulina dependen de la señalización de la vía PI3K-AKT [13], se evaluó la activación de AKT en respuesta a insulina en el tejido adiposo y en hígado de ratones silvestres y transgénicos obesos por medio de inmunoblot utilizando anticuerpos específicos para AKT fosforilado en la serina 473. La administración de insulina (2mU/g) por 5 minutos resultó en mayores niveles AKT fosforilado

comparado los niveles observados en el tejido adiposo de ratones no inyectados, lo que demuestra que tanto los animales silvestres como transgénicos son sensibles a insulina independientemente de la dieta con la que fueron alimentados por 3 meses (Fig. 15A). Sin embargo, los niveles basales de AKT fosforilado en tejido adiposo de los ratones con DN son mayores que los de DAG, lo que indica que la vía de señalización funciona de forma menos eficiente en ratones obesos. No se observaron diferencias en los niveles basales de AKT fosforilado en el tejido adiposo de animales silvestres y transgénicos alimentados con la DAG.

A diferencia de lo que ocurre con los animales alimentados por 3 meses, en el tejido adiposo de los ratones sujetos a los 6 meses de DAG se observó una disminución de la sensibilidad a insulina, ya que los niveles basales de AKT fosforilado fueron mayores en el tejido adiposo de los ratones alimentados con la DN en comparación con los niveles observados en los animales sujetos a la DAG donde son casi imperceptibles los niveles de pAKT (Fig. 15B). Sin embargo, la vía de señalización AKT se activa en respuesta a insulina tanto en animales alimentados con la DN o la DAG independientemente del genotipo (Fig. 15B).

Esta evidencia experimental indica que tanto los ratones alimentados con la DN o la DAG son sensibles a la insulina como se había observado en el test de resistencia a insulina (Fig. 12C) y que la expresión de NALP1b1 no modifica la sensibilidad del tejido adiposo a esta hormona.

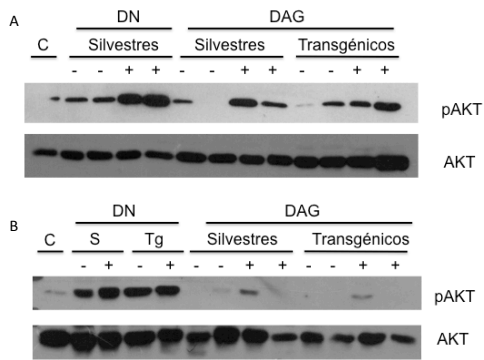


Figura 15. Nalp1b1 no afecta la vía de señalización de insulina en tejido adiposo A) Los niveles de AKT fosforilada (pAKT) y AKT se determinaron en extractos totales de tejido adiposo mesentérico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o una DAG durante 12 semanas, después de 16 h de ayuno a los cuales no se les administró (-) o se les administró 2 mU/g de insulina 5 min antes de ser sacrificados (+) B) Los niveles de AKT fosforilada (pAKT) y AKT se determinaron en extractos totales de hígado de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o una DAG durante 12 semanas, a los cuales no se les administró (-) o se les administró 2 mU/g de insulina 5 min antes de ser sacrificados (+). C = Control (Células HEK293)

Por otra parte también se analizaron los niveles de AKT fosforilado en hígado de ratones con 3 meses de dieta, ya que es uno de los principales órganos blanco de la insulina.

En el hígado de los ratones silvestres alimentados con la DN no se observan niveles basales de AKT fosforilado comparado con los ratones silvestres alimentados con la DAG (Fig. 16A), lo que indica que la vía PI3K-AKT se activa en hígado cuando se someten los ratones a una DAG. De acuerdo con esto, independientemente del fenotipo de los animales, la inyección de insulina resulto en un incremento en la fosforilación de AKT mayor en el hígado de los ratones alimentados con DAG que los niveles detectados en el hígado de los animales alimentados con la DN (Fig. 16A). A los 6 meses de dieta, se observó un nivel basal de AKT fosforilado a comparación de los 3 meses de dieta (Fig. 16B). Lo cual indica que a pesar de que consumen una DN, la edad tiene un efecto negativo en la señalización de insulina. Los animales con 6 meses de DN inyectados con insulina, presentaron un aumento tenue en de la fosforilación de AKT (Fig. 16B). Mientras que en los ratones con DAG, no se observó una diferencia clara entre los ratones estimulados y no estimulados con insulina. Esto sugiere que los ratones obesos presentan deficiencias en la vías de señalización de PI3K-AKT en hígado a los 6 meses de dieta y que la edad es un factor

importante en las deficiencias de esta vía. Finalmente se determinó que la expresión de Nalp1b1 no altera la respuesta del tejido hepático a la insulina.

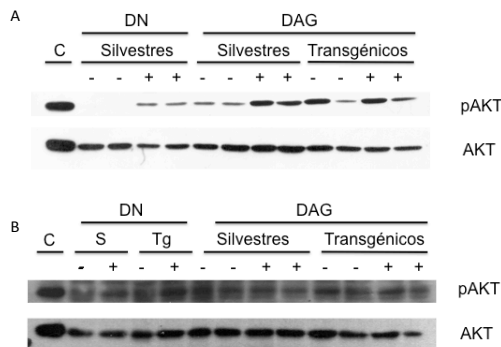


Figura 16. Nalp1b1 no afecta la vía de señalización de insulina en hígado. A Los niveles de AKT fosforilada (pAKT) y AKT se determinaron en extractos totales de tejido adiposo mesentérico de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o una DAG durante 24 semanas, después de 16 hrs de ayuno a los cuales no se les administro (-) o se les administro de insulina 5 min antes de ser sacrificados (+) B) Los niveles de AKT fosforilada (pAKT) y AKT se determinaron en extractos totales de hígado de ratones silvestres y transgénicos alimentados con DN o una DAG durante 24 semanas, a los cuales no se les administro (-) o se les administro de insulina 5 min antes de ser sacrificados (+).C = Control (Células HEK293)

6.6 NALP1b1 no altera el metabolismo de lipoproteínas

Dado que la dislipidemia es un componente característico del síndrome metabólico [27], evaluamos si la expresión de Nalp1b1 afecta el grado de dislipidemia inducido por la DAG. Para esto, se determinaron los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas en suero de los ratones silvestres o transgénicos alimentados con la DN o la DAG (Tabla 3).

Los niveles de colesterol presentes en el suero de los ratones sujetos a la DAG durante 3 meses es mayor, comparado con los ratones de DN; No se observó una diferencia significativa de los niveles de colesterol en animales de los distintos genotipos.

Asimismo se registraron mayores niveles de colesterol en ratones alimentados con DAG durante 6 meses a comparación de los alimentados con la DN. De igual manera, no se observó ninguna diferencia en los niveles de colesterol de los ratones silvestres y los ratones NALP1b1. Estos resultados sugieren que la expresión de NALP1b1 no induce un cambio en la hipercolesterolemia generada por el consumo de una DAG.

Los niveles lipoproteínas y triglicéridos presentes en el suero de los ratones sujetos a una DAG no mostraron una diferencia significativa cuando se compara con los de DN, tanto a los 3 meses de dieta como a los 6 meses de dieta. De igual manera cuando se comparan los niveles de triglicéridos y lipoproteínas entre los genotipos de los ratones tanto de DN como de DAG no exhiben diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias evidentes en el perfil lipídico entre ratones silvestres y transgénicos. Estos resultados señalan que la expresión de NALP1b1 no modifica la homeostasis de lípidos ni lipoproteínas durante el desarrollo de obesidad, lo cual concuerda con otros reportes donde determinan si los niveles de colesterol y triglicéridos varían en los knockouts de Casp1 $-/-$, ASC $-/-$ NALP3 $-/-$ y no registraron diferencias significativas [60, 78].

Tabla 3. Concentración de lípidos en plasma

Tiempo de dieta	Grupo	Colesterol (mg/dl)	HDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
3 Meses	DN - S	110	71	21	18	125
	DAG - S	179	117	21	41	128
	DAG - Tg	189	131	18	40	107
6 Meses	DN - S	128	71	31	26	186
	DN - Tg	127	73	26	28	160
	DAG - S	204	126	21	57	127
	DAG - Tg	205	124	20	61	119

7 DISCUSIÓN

Evidencia experimental, epidemiológica y clínica registrada durante las últimas décadas asocia moléculas y redes funcionales que forman parte de la respuesta inflamatoria con el desarrollo de enfermedades metabólicas o complicaciones que emergen de patologías como la obesidad y la diabetes tipo 2 [40]. Los mecanismos precisos que activan y mantienen la inflamación estéril en estos estados patológicos han empezado a ser dilucidados. Las principales citocinas pro-inflamatorias que median la inflamación en la obesidad son IL-1 β e IL-18, las cuales son procesadas por caspasa-1 cuando esta se encuentra asociada en complejos multiprotéicos conocidos como inflamasomas [53].

El inflamasoma de NALP3 es el principal sensor del exceso de lípidos; animales obesos carentes de NALP3 muestran una menor activación de caspasa-1 en el tejido adiposo que animales obesos silvestres. De acuerdo con la reducción de la respuesta inflamatoria los animales carentes de NALP3 también muestran una reducción en las alteraciones del metabolismo de la glucosa resultantes de la obesidad. Sin embargo, la reducción en la activación de caspasa-1 no es total en el tejido adiposo de los animales carentes de NALP3, lo que indica que otros inflamasomas también pueden responder al exceso de lípidos. De hecho, estudios previos han comprobado que la expresión de NALP1 aumenta en tejido adiposo cuando se induce obesidad mediante una DAG [80]. Por otra parte, animales que expresan el alelo *Nalp1b1* (Balb/c) no muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa cuando se sujetan a una DAG; en cambio, los animales que expresan el alelo *Nalp1b2* (C57BL/6) son susceptibles a desarrollar diabetes en respuesta a una dieta DAG [81]. No existe estudios previos que relacionen la expresión diferencial de alelos del gene NALP1b y la inflamación inducida por obesidad. En el presente estudio mostramos que el alelo NALP1b1 modula la magnitud de la metainflamación y favorece la euglicemia en animales obesos.

La obesidad deriva del incremento de la masa grasa y del correspondiente aumento en el peso corporal [93]. En ratones de la cepa C57BL/6 se puede inducir obesidad cuando se exponen a una DAG [87], este incremento en el peso se debe a que esta cepa exhibe una mayor eficiencia en la ganancia de peso por kilocalorías consumidas y por tanto en comparación de otras cepas presenta un mayor grado de hiperplasia en adipocitos [94]. De acuerdo con esto, nuestros resultados mostraron que tanto los ratones C57BL/6 silvestres (Nalp1b2) como los ratones C57BL/6 transgénicos (Nalp1b1/Nalp1b2) aumentaron de peso de forma constante durante la administración de la DAG. Lo que sugiere que la expresión del alelo Nalp1b1 no previene el desarrollo de obesidad en ratones de la cepa C57BL/6 inducida por un exceso de lípidos en la dieta. Contrario a nuestros resultados, previamente se había reportado que ratones de la cepa C57BL/6 deficientes para diferentes componentes del inflammasoma como caspasa-1, ASC y NALP3 [78] muestran una menor ganancia de peso que los ratones C57BL/6 silvestres. Esto sugiere que el la inflamación resultante del consumo de una DAG favorece el desarrollo de obesidad pero que la expresión del alelo Nalp1b1 no previene este proceso.

El aumento excesivo de grasa en el tejido adiposo, provoca un desequilibrio en la producción y en la secreción de adipocinas que favorecen la alteración en la sensibilidad a insulina, la glucemia, el metabolismo de lípidos y como consecuencia se propicia el desarrollo de inflamación [95]. Concordante con otros estudios [96], los animales silvestres (Nalp1b2) exhibieron deficiencias en la homeostasis de la glucosa a los 3 meses y 6 meses de la administración de la DAG. El incremento en los niveles de glucosa basal y la tolerancia a la glucosa en los ratones silvestres obesos comparado con los animales silvestres no obesos sugiere la existencia de un estado prediabético en estos animales [97]. Esto es consistente con otros trabajos donde se ha observado que desde la cuarta semana de ingerir una DAG se presenta hiperglicemia en animales C57BL/6J [98].

Los ratones transgénicos para el alelo NALP1b1 obesos fueron más sensibles a la glucosa comparado con los ratones silvestres en la prueba de tolerancia a

glucosa después de 3 meses de consumir una DAG. Estos resultados sugieren que el alelo Nalp1b1 previene la desregulación del metabolismo de la glucosa inducida por obesidad. Existen diversas explicaciones para este fenómeno. Se puede inferir que la expresión del alelo Nalp1b1 favorece la sensibilidad a glucosa probablemente previniendo la inflamación y el deterioro generado por la producción de IL-1 β o IL-18 en tejidos que regulan la homeostasis de la glucosa como el páncreas donde el continuo estrés metabólico provoca la estimulación del receptor de IL-1. La prevención de la activación autocrina o paracrina de este receptor previene la producción de citocinas pro-inflamatorias, la atracción de macrófagos, apoptosis, fibrosis y deficiencias en la secreción de insulina

[39, 99]. Por otra podría evitar que se genere una mayor resistencia a insulina a en tejidos que promueven la captación de glucosa periférica como músculo y tejido adiposo o que regulan la producción de glucosa como el hígado[100].

La asociación de la obesidad y la diabetes tipo 2 en sus etapas tempranas tiene un nexo en común: la resistencia a insulina y la hiperinsulinemia. Inicialmente, la resistencia a insulina es compensada por el páncreas que secreta más insulina, manteniendo los niveles glucémicos adecuados. Con el tiempo, la capacidad de secreción pancreática va disminuyendo, conduciendo a estados progresivos de hiperglucemia e hipoinsulinemia [101]. De acuerdo con esto, los ratones silvestres con dieta alta en grasa a los 3 meses de dieta presentan menores niveles de insulina, que los animales silvestres alimentados con la dieta normal. En contraste los ratones transgénicos mostraron valores similares de insulina a los de dieta normal. Así, la expresión de NALP1b1 previene la disminución de los niveles de insulina y por tanto mejora el metabolismo de la glucosa en animales obesos. La disminución de las alteraciones para regular la glucosa observada en los animales transgénicos posiblemente se relaciona con el hecho de que debe de haber un menor grado de inflamación en uno o varios tejidos involucrados en mantener la euglicemia de forma directa o indirecta.

Ciertamente observamos que los niveles de IL-1 β son ligeramente menores en el tejido adiposo de ratones obesos NALP1b que los observados en el tejido adiposo de los ratones silvestres obesos los que correlaciono también con el grado de activación de Caspasa-1. También fue evidente que existe un mayor

procesamiento de caspasa-1 e IL-1 β en ratones obesos y esto se incrementa a los 6 meses de dieta, lo cual ratifica la existencia de meta-inflamación en tejido adiposo como se ha descrito en otros estudios[77].

Por otra parte se ha descrito que las deficiencias en el tejido adiposo están asociadas con inflamación sistémica de bajo grado [95]. De acuerdo con esto, los niveles de IL-1 β en sangre de ratones NALP1b1 obesos son menores que los de los animales silvestres obesos, lo cual indica que existe una menor inflamación sistémica y concuerda con el hecho de que se presenten menores niveles de IL-1 β en tejido adiposo. Este dato también sugiere que también podría haber menor producción de IL-1 β en otros órganos como el hígado o el páncreas donde se ha reportado la activación de inflamomas en respuesta a una DAG [5, 60].

En conjunto nuestros resultados indican que los ratones transgénicos obesos presentan una inflamación menos severa que la de ratones silvestres obesos, probablemente debido a que NALP1b1 responde menos eficientemente que NALP1b2 al exceso de lípidos o que previene la activación de NALP3 y por tanto reduce la producción de IL-1 β e IL-18, aminorando los efectos nocivos de la metainflamación en ratones obesos. Probablemente los efectos dañinos que se estarían previniendo resultado de la presencia de IL-1 β en diferentes órganos son: la apoptosis en células β -pancreáticas [102], la resistencia a insulina en tejido adiposo [103] o que no se promueve la producción de otras citocinas pro-inflamatorias en músculo [104].

En contraste con el efecto protector de la expresión de Nalp1b1 en ratones sujetos a una DAG por 3 meses, los ratones (8 meses de edad) silvestres y transgénicos alimentados por los 6 meses con la DAG mostraron una respuesta similar de intolerancia a glucosa cuando se les realizó un prueba de tolerancia a glucosa. En este caso, una posibilidad para explicar por qué no es evidente la diferencia entre los dos grupos, es que el síndrome metabólico es más severo y la inflamación es mayor a los 6 meses de dieta. Ya que se ha planteado que la progresión de la obesidad y la activación de células del sistema inmune es diferente dependiendo de la etapa del desarrollo de obesidad [57]. La DAG con 60% de calorías derivadas de grasa duplica el peso en el tejido adiposo, incrementa el tamaño de los adipocitos, cuadruplica el contenido de triglicéridos

en una semana [105]. Además análisis de microarreglos han demostrado que genes asociados con respuestas inflamatorias cambian a los 3 días de administrar una DAG [106], lo cual sugiere que existe una respuesta inmune a corto plazo. Por otra parte se ha descrito que los efectos a largo plazo después de semanas de DAG, se altera la remodelación tejido adiposo y esto correlaciona con el desarrollo de resistencia a insulina, la infiltración de macrófagos, la muerte de los adipocitos y la producción de citocinas proinflamatorias. Estos eventos incrementan conforme aumentan las semanas de consumo de la DAG. Se ha observado que a las 12 semanas de dieta el número de adipocitos disminuye, mientras que a las 16 semanas de dieta la proporción de adipocitos muertos es de 80 % con la máxima expresión de genes inflamatorios, asociado con una deposición de colágeno y una macroesteatosis hepática. Además la muerte de los adipocitos correlaciona con el desarrollo de resistencia a insulina (RI). El desarrollo de RI a las 8 semanas con DAG coincide con el incremento de la expresión de marcadores de macrófagos en tejido adiposo. Katherine J. Strissel et al. observaron que la RI sigue aumentando a las 12, 16 y 20 semanas [23]. Estos datos demuestran que la respuesta inmune ante el exceso de una DAG es más exacerbada conforme pasa el tiempo, generando una inflamación más frecuente e intensa. Otros estudios que también confirman este incremento en la inflamación en relación a la obesidad, han registrado que la activación de caspasa-1 es progresiva, observaron que es mayor a las 28 semanas de DAG (9 meses de edad) comparado con 16 semanas de DAG (6 meses de edad) [60]. De acuerdo a los resultados observados a los 6 meses de dieta, nosotros planteamos que además de IL-1 β e IL-18 otras citocinas como TNF-alfa [107] e IL-6 [108] podrían estar exacerbando la intolerancia a glucosa y resistencia a insulina en tejido adiposo, hígado o músculo a los 6 meses de dieta, encubriendo el efecto protector de NALP1b1.

Interesantemente, y contrario a lo que esperábamos las alteraciones en el metabolismo de glucosa en los animales silvestres y transgénicos no correlacionaron con el desarrollo de resistencia a insulina ya que la prueba de resistencia a insulina mostró que tanto los ratones alimentados con la DN como

con la DAG son sensibles a insulina. Esta discrepancia con los resultados publicados donde muestran que esta cepa es resistente a insulina desde los 3 meses con DAG [87] podría estar vinculada con el hecho de que el C57BL/6J es más sensible a insulina exógena que otras cepas [109] y que el mayor instigador de intolerancia a glucosa son las deficiencias de secreción de insulina contrastado con la resistencia a insulina [90]. Además Collins SC et al. reportaron una tendencia de hipoinsulinemia en ratones obesos de la cepa C57BL/6J a las 15 semanas de DAG. Los mismos autores encontraron que la cepa C57BL/6J a las 3 semanas de DAG comparado con los ratones con DN presentan los mismos niveles de insulina en los islotes pancreáticos, pero la secreción de insulina era dos veces mayor en los ratones con DAG. Mientras que a las 15 semanas de DAG, a pesar que presentan mayor producción de insulina (15%) comparado con los de DN, determinaron que la secreción de insulina fue de 25-30% menor [110].

Por otra parte, el hecho de que los ratones silvestres o transgénicos alimentados con la DN o la DAG presenten la misma sensibilidad a insulina indica que la disminución del control del metabolismo de glucosa se exacerba con la edad. El envejecimiento está asociado a deficiencias en la acción y secreción de la insulina [111]. Se ha demostrado que las islas pancreáticas de animales adultos tienen disminuido la secreción de vesículas de insulina en respuesta a la estimulación de glucosa, así como la producción de AMPc. Además se ha comprobado que se reduce con la edad la expresión del transportador de glucosa GLUT-2 en células pancreáticas [112].

Para valorar el estado diabético de los ratones silvestres o transgénicos sometidos a la DN o la DAG, es necesario comprender como es la progresión de la diabetes tipo 2 y como se intensifica a través de mecanismos compensatorios como hiperinsulinemia e hiperglucemia, los cuales en etapas tempranas previenen defectos en la captación de glucosa y deposición de glucosa.

En los primeros estadios se presentan defectos en el almacenamiento de la glucosa, en esta etapa existe una tolerancia a glucosa alterada y se presenta una diabetes con hiperinsulinemia transitoria. Posteriormente se pierde la respuesta

hiperinsulinémica ante la hiperglucemia, dando lugar a la resistencia a insulina. La secreción de insulina desciende gradualmente como consecuencia de la hiperglicemia crónica y da como resultado una descompensación pancreática, lo cual es considerado como diabetes tipo 2 caracterizada por hipoinsulinemia [1].

De acuerdo con el estudio realizado por Golay [113] donde describe estas fases en animales obesos y que culminan en diabetes tipo 2, los ratones silvestres alimentados por 3 meses con la DAG presentan tolerancia a glucosa alterada y tendencia a la hipoinsulinemia comparado con los ratones NALP1b1 los cuales presentan un cuadro de tolerancia a glucosa casi normal con niveles normales de insulina; Mientras que, los ratones silvestres alimentados 6 meses con la DAG exhiben diabetes con hipoinsulinemia y los ratones NALP1b1 presentan diabetes con hiperinsulinemia.

En conjunto estos resultados indican que la expresión de NALP1b1 beneficia el metabolismo de los ratones transgénicos y retrasa la evolución de la diabetes, consecuencia de una menor respuesta inflamatoria ante los efectos lipotóxicos y glucotóxicos presentes en el síndrome metabólico, probablemente debido a una menor activación del inflamasoma NALP1b1 o de la modulación de la activación de otros inflamasomas.

Interesantemente existe un estudio donde observan este mismo fenómeno, Yun-Hee Youm et al.[114] mostraron que los ratones knockout NALP3 con obesidad inducida mediante una DAG, tienen el doble o el triple de insulina en comparación de los animales silvestres. Además demostraron que la fibrosis en las islas pancreáticas y la muerte de células β -pancreáticas es menor en el knockout de NALP3. La inhibición de este inflamasoma probablemente aminora la producción de IL- β la cual se ha comprobado que perjudica la secreción de insulina e induce la expresión de Fas, promoviendo la apoptosis [102]. De igual manera, se sabe que el estrés metabólico (altos niveles de glucosa y de ácidos grasos) inducen la producción de IL-1 β en células β pancreáticas [115], esta producción local puede promover de forma paracrina la infiltración de macrófagos en las islas pancreáticas[116]. Esta respuesta fomenta una mayor producción de IL-1 β en

esa zona, la cual contribuye la muerte de células β [117]. Por lo que es válido hipotetizar que la expresión de Nalp1b1 en los animales transgénicos protege del daño inflamatorio en páncreas generado por los efectos glucolipotóxicos presentes en la obesidad. Así, la activación NALP1b1 en macrófagos presentes en los islotes pancreáticos podría regular negativamente la producción de IL-1 β , previniendo la apoptosis de células β -pancreáticas, la deposición de matriz extracelular y las deficiencias en la secreción de insulina (Fig.17).

Puesto que se había determinado que los ratones exhibían cuadros prediabéticos y diabéticos con hiperinsulinemia o hipoinsulinemia y que además presentaban inflamación crónica de bajo grado surgió la cuestión de determinar si esta metainflamación instigada en parte por la infiltración de macrófagos y la respectiva producción de citocinas proinflamatorias en tejido adiposo e hígado estuviese alterando la vía de señalización intracelular de insulina en adipocitos y hepatocitos.

Es reconocido que en la obesidad los macrófagos del tejido adiposo e hígado se polarizan a un fenotipo M1 pro-inflamatorio que detecta la acumulación de lípidos y forman estructuras en forma de corona para reparar el daño celular [22, 118] y secretan citocinas como TNF- α , IL-6 e IL- β [119]. Se ha comprobado que IL-1 β interfiere directamente con la señalización de insulina en tejido adiposo, no se activan proteínas [103] consideradas como nodos clave en la vía de insulina PI3K y de ERK1/2 [13]. Mientras que por otra parte se ha demostrado que la producción de IL-1 β en tejido adiposo induce resistencia a insulina en hígado[120].

Contrario a lo esperado, nuestros resultados no coinciden con los de los reportes que indican que la vía PI3K se ve alterada en el nodo de señalización de AKT en tejido adiposo cuando se induce obesidad mediante una DAG [121]. En tejido adiposo de los ratones silvestres y transgénicos alimentados con la DAG respondieron al bolo de insulina induciendo la fosforilación de AKT de manera similar. Lo relevante de estos resultados es que coinciden con el hecho de que los ratones obesos son sensibles al bolo de insulina y disminuyen los niveles de

glucosa en sangre. Esto sugiere que la posible causa de la intolerancia a glucosa sean deficiencias en la secreción de insulina y no en la señalización en la vía PI3K. Finalmente, el análisis de los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma de los animales alimentados con la DAG reveló que los ratones silvestres con obesidad y diabetes tipo 2 presentaban el cuadro completo de síndrome metabólico ya que de acuerdo a lo reportado se observaron alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas incluyendo elevados niveles de triglicéridos, bajos niveles de proteínas de baja densidad y altos niveles de proteínas de alta densidad [42]. Sin embargo la expresión de Nalp1b1 no modificó estos parámetros. Lo cual concuerda con reportes que indican que los animales deficientes en la expresión de Caspasa-1, ASC y NALP no presentan diferencias en los niveles de triglicéridos y colesterol inducidos por una DAG [78]. En conjunto, estos resultados sugieren que los inflamasomas no afectan directamente el metabolismo de lipoproteínas.

En síntesis, nuestros resultados sugieren que NALP1 no solo tiene un papel en infecciones como previamente se ha reportado [71], si no que además participa durante la progresión del síndrome metabólico y que la expresión del alelo 1 de NALP1b puede favorecer la homeostasis de la glucosa. Proponemos que la expresión de NALP1b1 beneficia el metabolismo de los ratones transgénicos y retrasa la aparición de diabetes, como resultado de generar una menor respuesta inflamatoria ante el exceso de lípidos, ROS, IAPP o glucosa. El mecanismo por el cual se presenta un fenotipo metabólico menos alterado probablemente se deba a una modulación en la activación de los inflamasomas involucrados en detectar daño celular generado por la metainflamación. Esta regulación negativa de la inflamación puede estar dada por la competencia con proteínas efectoras con otros inflamasomas o por la formación de heterodímeros de NALP1b1 con diferentes alelos de NALP1b, con las proteínas traducidas de genes parálogos como NALP1a o NALP1c o con otros inflamasomas que se activan en tejidos específicos (Fig.17).

En México el 70 % de la población adulta sufre de sobrepeso. Hoy en día nos encontramos en el segundo lugar con mayor índice de obesidad con el 30%. Al 2012, nuestro país ocupa el cuarto lugar de obesidad infantil. La encuesta nacional de salud indica que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años ha aumentado de un 26% (2006) a un 34% (2012). Por tanto, sería interesante determinar si existe alguna relación entre polimorfismos del gen de Nalp1 en humanos y el desarrollo de enfermedades metabólicas particularmente en individuos con obesidad infantil. Interesantemente, ya se ha demostrado una fuerte asociación de polimorfismos de Nalp1 asociados a enfermedades como Addison y vitíligo.

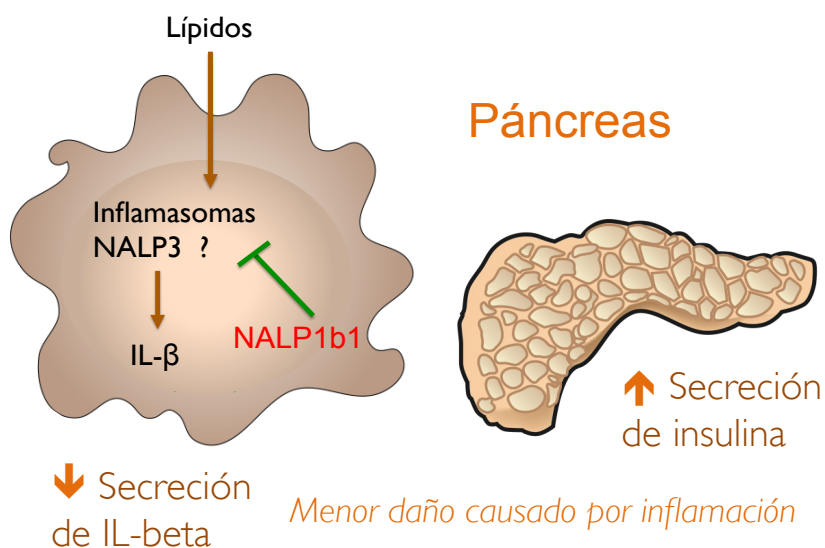


Figura 17. Modelo de la regulación de NALP1b1 en la metainflamación.

8 CONCLUSIONES

- La expresión de NALP1b1 en ratones C57BL/6J a los que se les induce obesidad mediante una dieta alta en grasa no altera la ganancia de peso, el consumo de comida, los niveles basales de lípidos en sangre y la sensibilidad a insulina en tejido adiposo e hígado.
- La expresión de NALP1b1 reduce los niveles de glucémicos a los 3 meses de dieta, favorece la homeostasis de la glucosa.
- Existe una diferencia significativa en la tolerancia a glucosa entre ratones silvestres y transgénicos, lo que sugiere que la expresión de NALP1b1 favorece el metabolismo de la glucosa.
- NALP1b1 participa en la inflamación inducida por obesidad, modula el procesamiento de IL-1 β , induce una menor inflamación a nivel sistémico y en tejido adiposo.
- Los resultados en este estudio muestran que los ratones NALP1b1 tienen mayores niveles de insulina en sangre, lo cual sugiere que la disminución de la inflamación en estos animales resulta en menor daño a las células beta pancreáticas lo que les permite mantener la producción de insulina y evitar efectos glucotóxicos.

9 REFERENCIAS

1. Rosas Guzmán J, L.R., Cacalcanti Ney, *Diabetes Mellitus: Visión latinoamericana*. 1ª ed, ed. S. Inter. 2009, Brazil: AC Farmaceutica.
2. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. 2005, New York: W.H. Freeman. ca. 615 p. in various pagings.
3. Hajduch, E., G.J. Litherland, and H.S. Hundal, *Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport?* FEBS Lett, 2001. **492**(3): p. 199-203.
4. Virkamaki, A., K. Ueki, and C.R. Kahn, *Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 931-43.
5. White, M.F., *The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 3-11.
6. White, M.F., *The insulin signalling system and the IRS proteins*. Diabetologia, 1997. **40 Suppl 2**: p. S2-17.
7. Youngren, J.F., *Regulation of insulin receptor function*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(7-8): p. 873-91.
8. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.
9. Bhattacharya, S., D. Dey, and S.S. Roy, *Molecular mechanism of insulin resistance*. J Biosci, 2007. **32**(2): p. 405-13.
10. Taguchi, A. and M.F. White, *Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 191-212.
11. Biddinger, S.B. and C.R. Kahn, *From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 123-58.
12. McCarthy, A.M. and J.S. Elmendorf, *GLUT4's itinerary in health & disease*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 373-88.
13. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
14. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(10): p. 371-9.
15. Wells, J.C., *The evolution of human adiposity and obesity: where did it all go wrong?* Dis Model Mech, 2012. **5**(5): p. 595-607.
16. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 847-53.
17. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales>
18. Low, S., M.C. Chin, and M. Deurenberg-Yap, *Review on epidemic of obesity*. Ann Acad Med Singapore, 2009. **38**(1): p. 57-9.
19. Rutkowski, J.M., K.E. Davis, and P.E. Scherer, *Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue*. FEBS J, 2009. **276**(20): p. 5738-46.
20. Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance*. Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2169-80.

21. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.
22. Murano, I., et al., *Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice*. J Lipid Res, 2008. **49**(7): p. 1562-8.
23. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
24. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-9.
25. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
26. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 125-38.
27. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
28. Summers, S.A., *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(1): p. 42-72.
29. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
30. Wymann, M.P. and R. Schneiter, *Lipid signalling in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 162-76.
31. Hohmeier, H.E., et al., *Inflammatory mechanisms in diabetes: lessons from the beta-cell*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S12-6.
32. Chen, L., D.J. Magliano, and P.Z. Zimmet, *The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(4): p. 228-36.
33. Antonio, G.C., *Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico*. Revista mexicana de cardiología, 1999. **10**(1): p. 3-19.
34. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
35. Moller, D.E. and K.D. Kaufman, *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 45-62.
36. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
37. Solinas, G. and M. Karin, *JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction*. FASEB J, 2010. **24**(8): p. 2596-611.
38. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.
39. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 98-107.
40. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
41. Martínez de Morentin, R.M.C., *Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo tisular*. Endocrinología y nutrición, 2003. **50**(8): p. 324-333.
42. Kolovou, G.D., K.K. Anagnostopoulou, and D.V. Cokkinos, *Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome*. Postgrad Med J, 2005. **81**(956): p. 358-66.
43. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.

44. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
45. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 85-97.
46. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-31, G-12, AN-27, I-27 p.
47. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
48. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
49. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 707-35.
50. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
51. Bryant, C. and K.A. Fitzgerald, *Molecular mechanisms involved in inflammasome activation*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(9): p. 455-64.
52. Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns, *NALPs: a novel protein family involved in inflammation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(2): p. 95-104.
53. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
54. Wagner, R.N., et al., *Evaluation of Nod-like receptor (NLR) effector domain interactions*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e4931.
55. Rathinam, V.A., S.K. Vanaja, and K.A. Fitzgerald, *Regulation of inflammasome signaling*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 333-2.
56. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.
57. Sun, S., et al., *Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue*. Annu Rev Nutr, 2012. **32**: p. 261-86.
58. Zhou, R., et al., *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
59. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 408-15.
60. Vandanmagsar, B., et al., *The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 179-88.
61. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
62. Masters, S.L., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 897-904.
63. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.
64. Matsuki, T., et al., *IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 877-88.

65. Netea, M.G., et al., *Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 650-6.
66. Donath, M.Y., et al., *Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy*. Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S161-4.
67. Troseid, M., I. Seljeflot, and H. Arnesen, *The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome*. Cardiovasc Diabetol, 2010. **9**: p. 11.
68. Jin, Y., et al., *NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(12): p. 1216-25.
69. Pontillo, A., et al., *NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2012. **26**(3): p. 277-81.
70. Magitta, N.F., et al., *A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes*. Genes Immun, 2009. **10**(2): p. 120-4.
71. Faustin, B., et al., *Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 713-24.
72. Liao, K.C. and J. Mogridge, *Expression of Nlrp1b inflammasome components in human fibroblasts confers susceptibility to anthrax lethal toxin*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4455-62.
73. D'Osualdo, A., et al., *CARD8 and NLRP1 undergo autoproteolytic processing through a ZU5-like domain*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27396.
74. Kummer, J.A., et al., *Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(5): p. 443-52.
75. Boyden, E.D. and W.F. Dietrich, *Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 240-4.
76. Frew, B.C., V.R. Joag, and J. Mogridge, *Proteolytic processing of Nlrp1b is required for inflammasome activity*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002659.
77. Stienstra, R., et al., *The inflammasome puts obesity in the danger zone*. Cell Metab, 2012. **15**(1): p. 10-8.
78. Stienstra, R., et al., *Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(37): p. 15324-9.
79. Boden, G., *Ceramide: a contributor to insulin resistance or an innocent bystander?* Diabetologia, 2008. **51**(7): p. 1095-6.
80. Sun, S., et al., *The ATP-P2X7 signaling axis is dispensable for obesity-associated inflammasome activation in adipose tissue*. Diabetes, 2012. **61**(6): p. 1471-8.
81. West, D.B., et al., *Dietary obesity in nine inbred mouse strains*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. R1025-32.
82. Andrikopoulos, S., et al., *Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet*. J Endocrinol, 2005. **187**(1): p. 45-53.
83. Kanasaki, K. and D. Koya, *Biology of obesity: lessons from animal models of obesity*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 197636.
84. de Zoete, M.R. and R.A. Flavell, *NLRP1 Joins the Dark Side?* Immunity, 2012. **37**(6): p. 950-2.
85. Heikkinen, S., et al., *Evaluation of glucose homeostasis*. Curr Protoc Mol Biol, 2007. **Chapter 29**: p. Unit 29B 3.

86. Rajamaki, K., et al., *Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11765.
87. Fraulob, J.C., et al., *A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet*. J Clin Biochem Nutr, 2010. **46**(3): p. 212-23.
88. Ayala, J.E., et al., *Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice*. Dis Model Mech, 2010. **3**(9-10): p. 525-34.
89. Burcelin, R., et al., *Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(4): p. E834-42.
90. Ahren, B. and G. Pacini, *Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E738-44.
91. Strowig, T., et al., *Inflammasomes in health and disease*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 278-86.
92. Pickup, J.C. and M.A. Crook, *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia, 1998. **41**(10): p. 1241-8.
93. Stein, C.J. and G.A. Colditz, *The epidemic of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2522-5.
94. Surwit, R.S., et al., *Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice*. Metabolism, 1995. **44**(5): p. 645-51.
95. Schipper, H.S., et al., *Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 407-15.
96. Berglund, E.D., et al., *Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1790-9.
97. Han, B.G., et al., *Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(4): p. E981-6.
98. Collins, S., et al., *Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics*. Physiol Behav, 2004. **81**(2): p. 243-8.
99. Donath, M.Y., et al., *Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 325-31.
100. Bogan, J.S., *Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 507-32.
101. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Med Clin North Am, 2004. **88**(4): p. 787-835, ix.
102. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
103. Lagathu, C., et al., *Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes*. Diabetologia, 2006. **49**(9): p. 2162-73.
104. Luo, G., et al., *IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(5): p. R1249-54.

105. Kleemann, R., et al., *Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8817.
106. Li, J., et al., *Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(6): p. E1334-41.
107. Moller, D.E., *Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(6): p. 212-7.
108. Eder, K., et al., *The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity*. Inflamm Res, 2009. **58**(11): p. 727-36.
109. Kaku, K., et al., *Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control*. Diabetes, 1988. **37**(6): p. 707-13.
110. Collins, S.C., et al., *Progression of diet-induced diabetes in C57BL/6J mice involves functional dissociation of Ca²⁺(+) channels from secretory vesicles*. Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1192-201.
111. Reaven, G., *Age and glucose intolerance: effect of fitness and fatness*. Diabetes Care, 2003. **26**(2): p. 539-40.
112. LeRoith, D., S.I. Taylor, and J.M. Olefsky, *Diabetes mellitus : a fundamental and clinical text*. 3rd ed. 2004, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xvi, 1540 p.
113. Felber, J.P. and A. Golay, *Pathways from obesity to diabetes*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26 Suppl 2**: p. S39-45.
114. Youm, Y.H., et al., *Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage*. Endocrinology, 2011. **152**(11): p. 4039-45.
115. Boni-Schnetzler, M., et al., *Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5218-29.
116. Ehses, J.A., et al., *Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2356-70.
117. Ehses, J.A., et al., *Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 340-2.
118. Lefkowitz, J.H., J.H. Haythe, and N. Regent, *Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis*. Mod Pathol, 2002. **15**(7): p. 699-704.
119. Ogawa, W. and M. Kasuga, *Cell signaling. Fat stress and liver resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1483-4.
120. Nov, O., et al., *Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4247-56.
121. Sabio, G., et al., *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1539-43.