



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE LA REGULACIÓN
DE LA H3K9ac EN UN MODELO *IN VITRO* DE
NEUROBLASTOMA HUMANO DIFERENCIADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IKER FRANCISCO SOTO SANTARRIAGA



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. MANUEL FLORES LEÓN
2017**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del M. en C. Manuel Flores León y la Dra. Clorinda Arias Álvarez, quienes recibieron apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN202615).

AGRADECIMIENTOS:

A la Q.F.B Patricia Suyapa Ferrera Boza por el apoyo técnico proporcionado en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra por la asesoría brindada y su apoyo en la realización de los experimentos.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su asistencia en la implementación y análisis técnicas de microscopia.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
MARCO TEÓRICO	9
EPIGENÉTICA	10
ACETILACIÓN DE HISTONAS	11
SIRT1 Y SU PAPEL COMO SENSOR METABÓLICO	16
SIRT1 Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	19
ÁCIDO PALMÍTICO Y SU PAPEL COMO COMPONENTE DE LAS HFD	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
CULTIVO CELULAR	23
TRATAMIENTO CON ÁCIDO PALMÍTICO	24
ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE MTT	25
WESTERN BLOT	25
TINCIÓN DE ROJO OLEOSO	29
INMUNOFLUORESCENCIA	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	30
RESULTADOS	31
EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO DIFERENCIADO (MSN) TRATADOS CON AP.	31
ANÁLISIS DE LA INCORPORACIÓN DEL AP POR PARTE DE LAS CÉLULAS.	32
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PROTEICOS DE SIRT1.	34
EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN EL NIVEL DE ACETILACIÓN DE H3K9ac35	
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO I	54
ANEXO II	54

RESUMEN

Las desacetilasas de histonas clase III (Sirtuinas), son proteínas dependientes de NAD^+ consideradas un vínculo importante entre el metabolismo, la fisiología celular y la regulación génica. Esto se debe a que poseen la capacidad de censar cambios en el estado metabólico de la célula y producir una respuesta; la cual puede ser directa mediante la modificación de la cromatina o indirecta al alterar la actividad de proteínas no histónicas. En el cerebro, un órgano con una alta actividad metabólica, la Sirtuina 1 (SIRT1) está implicada en el mantenimiento de la salud neuronal durante procesos como el desarrollo, la diferenciación y el envejecimiento.

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que el ácido graso saturado conocido como ácido palmítico (AP) disminuye la actividad y los niveles proteicos de SIRT1 en cultivos de neuronas de hipocampo; dicho cambio es acompañado por la aparición de algunos marcadores bioquímicos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, algo que se desconoce es si la actividad reducida de SIRT1 generada por el AP afecta los niveles de acetilación de histonas como la H3K9ac. Para analizar los efectos del AP en la acetilación de histonas, se utilizó una línea celular de neuroblastoma humano diferenciado con ácido retinoico y factor de crecimiento nerviosos (RA y NGF, por sus siglas en inglés).

Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones AP durante distintos periodos de tiempo. Se encontró que una exposición a 300 μM de AP induce cambios diferenciales en los niveles de H3K9ac a lo largo del tiempo. Durante las primeras seis horas de exposición se observó un incremento significativo en los niveles de H3K9ac. Sin embargo, para las veinticuatro horas de exposición lo que se observó fue un decremento en los niveles de acetilación por debajo de los niveles del control. Los cambios anteriormente mencionados correlacionan con una reducción en los niveles de SIRT1 y un incremento en el número de cuerpos lipídicos posterior a veinticuatro horas de tratamiento. Los cambios en la acetilación se determinaron mediante western-blot e inmunofluorescencia; los niveles proteicos de SIRT1 se midieron a través de western-blot y la cuantificación de cuerpos lipídicos se realizó mediante la tinción de rojo oleoso.

En conjunto, estos resultados sugieren que el AP induce cambios metabólicos que se asocian con un decremento en los niveles proteícos de SIRT1 y cambios diferenciales observados en los niveles de H3K9ac. En adición, la reducción en los niveles de H3K9ac después de veinticuatro horas de exposición sugiere que la actividad de otras desacetilasas de histonas (HDACs por sus siglas en inglés) podría estar siendo promovida por el AP.

ABSTRACT

Class III NAD⁺ dependent deacetylases (Sirtuins) are an important link between metabolism, cell function and gene regulation. They can sense changes in the metabolic state and produce a cellular response either via modifications on the chromatin or by altering the activity of non-histone proteins. In the brain, an organ with a high level of metabolic activity, Sirtuin 1 (SIRT1) is implicated in maintaining neuronal health during development, differentiation and ageing.

Previous work in the laboratory demonstrated that the saturated fatty acid, palmitic acid (PA), decreases both the activity and the protein levels of SIRT1 in cultured hippocampal neurons. This change was accompanied by the appearance of some biochemical markers characteristic of Alzheimer's disease. However, it is still unknown if the reduced activity of SIRT1 mediated by PA affects the acetylation levels of histone targets such as H3K9ac. In this study, the human neuroblastoma cell line (MSN) differentiated with retinoic acid and NGF was used to analyze the effects of PA on histone acetylation. The cells were exposed to different non-toxic concentrations of PA for distinct periods of time.

We found that 300 μ M of PA induced differential changes in the levels of H3K9ac along time. During the first six hours of exposure to PA, a significant increase in H3K9ac levels was observed. However, at 24 hours of exposure there was a decrease in the acetylation level of H3K9 below control levels. The aforementioned changes correlate with a reduction of SIRT1 content and an increase in the number of lipid bodies after 24 hours of treatment as shown by western blot assays and oil red staining protocol.

Collectively, these results suggest that PA contributes to an altered neural lipid metabolism, which in turn produces a decrease in the protein content of SIRT1. In addition, the reduced levels of H3K9ac after 24 hours of exposure suggest that the activity of other HDACs could be upregulated by PA.

MARCO TEÓRICO

Los avances médicos del siglo pasado han permitido que los humanos tengan vidas más largas y de mejor calidad. Sin embargo, dicho aumento en la longevidad también ha contribuido al aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas al envejecimiento como la demencia: la cual es un síndrome de naturaleza progresiva causado por un conjunto de enfermedades (ej. Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy) que afectan procesos cognitivos como la memoria, y que repercuten en la autosuficiencia del individuo además de provocar la muerte de éste en sus etapas más avanzadas.

Las enfermedades responsables de causar demencia son un grupo de padecimientos complejos cuyo origen es multifactorial y multimecanístico e involucra factores tanto genéticos como ambientales. Varias investigaciones indican que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades y es por este motivo que la obesidad se considera un factor de riesgo que promueve la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), que es el tipo de demencia mas frecuente entre los ancianos. Por lo tanto, a fin de poder describir la etiología de este tipo de enfermedades, así como diseñar mejores formas de detectarlas y atenderlas, es de vital importancia tratar de entender los mecanismos moleculares que vinculan a las alteraciones metabólicas con algunos efectos deletéreos sobre el cerebro.

Dicha interrogante se busca abordar mediante el presente trabajo, en el cual se analizan los cambios epigenéticos generados por una exposición a ácido palmítico y cómo esto se relaciona con alteraciones metabólicas que disminuyen la actividad de Sirtuina 1, una desacetilasa de histonas que también funge como sensor metabólico celular.

Epigenética

La epigenética es la ciencia que estudia los cambios heredables del fenotipo que no implican un cambio en la secuencia de DNA y que pueden ser reversibles¹. Esta disciplina tiene un enfoque particular sobre la cromatina puesto que muchos de los mecanismos de regulación epigenética que se han descrito actúan sobre ésta para controlar la expresión genética. La cromatina es el complejo ribonucleoproteico (histonas, proteínas no histónicas, ncRNA) que permite al DNA compactarse dentro del núcleo. De acuerdo a su grado de compactación la cromatina se puede clasificar en eucromatina y heterocromatina (Figura 1). La eucromatina se encuentra en un estado laxo que es permisivo para la transcripción mientras que la heterocromatina es densa, compacta y está asociada a secuencias de DNA transcripcionalmente inactivas².

Aunque funcionalmente diferentes, tanto la eucromatina como la heterocromatina comparten una unidad estructural básica llamada nucleosoma. Este consiste en aproximadamente 146pb de DNA enrollado alrededor de un octámero de histonas (compuesto por pares de las histonas H2A, H2B, H3 y H4)³. (Figura 2)

Las modificaciones covalentes y no covalentes (variantes de la histonas: ej.H3.1,H3.2, H3.3) de las histonas son esenciales para la regulación de la estructura de la cromatina; éstas juegan un papel importante en la modulación de procesos como la transcripción, replicación y reparación del DNA, además que de esto depende el arreglo espacial del genoma dentro del núcleo^{4,5}.

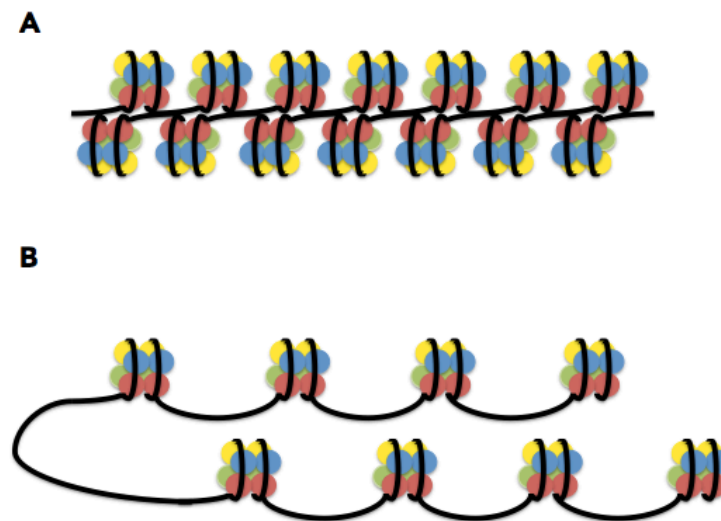


Figura 1. Tipos de cromatina. El esquema A corresponde a una fibra de heterocromatina compacta, el esquema B corresponde a una fibra de eucromatina laxa.

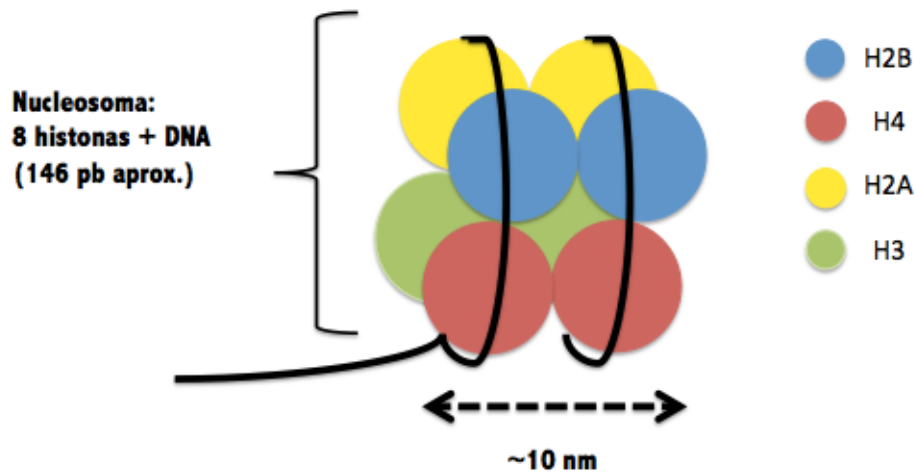


Figura 2. Esquema de la estructura básica de un nucleosoma

En gran medida, las modificaciones covalentes de las histonas se dan en la región N-terminal de estas proteínas. Dentro de estas modificaciones post-traduccionales se encuentran la metilación de residuos de arginina; acetilación, metilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación y sumoilación de residuos de lisina; y la fosforilación de residuos de serina y treonina, entre otros⁵. La acetilación de las lisinas en la región N-terminal de las histonas es una de las marcas epigenéticas mejor caracterizada debido a que esta modificación post-traduccionales influye directamente en la asociación física entre el DNA y las histonas².

Acetilación de histonas

La acetilación neutraliza las cargas positivas del nucleosoma provocando que la fuerza de atracción electrostática entre histonas y DNA se debilite. Se cree que esto favorece la descondensación de la cromatina y facilita el acceso de elementos como la RNAPol II y factores de transcripción⁶. La presencia de la acetilación es característica de zonas transcripcionalmente activas y es por esta razón que se le considera una marca epigenética que identifica a la eucromatina.

La acetilación de las histonas es mediada por proteínas con actividad acetil transferasa (HATs por sus siglas en inglés), mientras que la remoción de esta modificación post-traducciona se lleva a cabo por enzimas desacetilasas de histonas (HDACs por sus siglas en inglés). Actualmente, se sabe que la acción de las HATs y las HDACs no se limita a las histonas; existen evidencias de que estas enzimas también son capaces de modificar otro tipo de proteínas como factores de transcripción, chaperonas, mediadores de la respuesta inflamatoria, proteínas estructurales y transductores de señales⁷. Sin embargo, por razones históricas, las HATs y HDACs conservan el nombre que se les otorgó cuando fueron descritas por primera vez⁸⁻¹¹.

Para realizar su función, las HATs realizan la transferencia del grupo acetilo presente en la molécula de Acetil-CoA al grupo amino de un residuo de lisina (Figura 3).

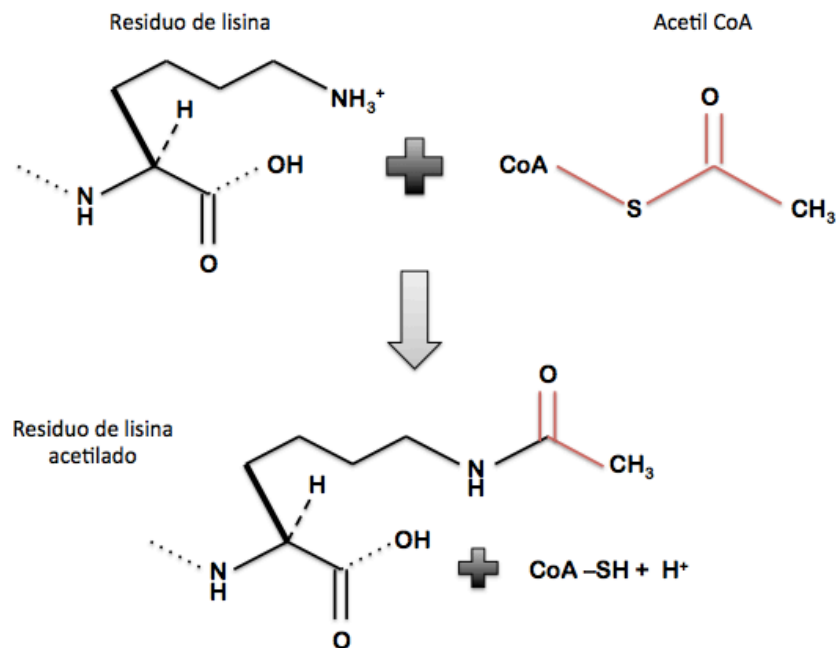


Figura 3. Reacción de transferencia del grupo acetilo al residuo de lisina del extremo N-terminal de la histona: A partir de una molécula de Acetil CoA las enzimas tipo HAT transfieren un acetilo al residuo de lisina de la histona. (Modificado de Biochemistry 7th Edition)

Cabe mencionar, que las enzimas acetil transferasas pueden dividirse en dos clases (A y B): La clase A se compone por HATs nucleares y contiene a la familia GNAT (N-acetil transferasa relacionada a Gcn5); la familia MYST cuyos miembros principales son MOZ, YBF2/SAS3 y TIP60, la familia p300/CBP, la familia basal TF y la familia NRCF^{10,12}. Por otro lado, la clase B esta compuesta por HATs citoplasmáticas como lo son HAT1, HAT2 y HAT4¹².

La acetilación de los extremos N-terminal de las histonas es un proceso altamente específico; la gran diversidad de enzimas HATs no implica que su función sea redundante, la evidencia indica que diferentes enzimas actúan de manera preferencial sobre sustratos específicos^{8,13,14}. Por ejemplo, las HATs de la familia p300/CBP solamente acetilan a histonas H3 y H4 mientras que en el caso de la familia GNAT se ha reportado que además de la H3 y H4 también pueden acetilar histonas H2A y H2B⁹. En adición, la función de las HATs generalmente está asociada a complejos proteicos conformados por otro tipo de activadores transcripcionales como factores de transcripción, receptores nucleares, coactivadores y corepresores⁹. Es por esto que se considera que la acetilación de histonas es un proceso controlado por patrones de asociación complejos que no solo dependen de las HATs sino también de las HDACs y del equilibrio que se establece entre la función de estos dos tipos de enzimas con funciones antagónicas. .

Como ya se menciona, las HDACs son enzimas que tienen la capacidad de remover los grupos acetilos de sus proteínas diana, ya sean histonas u otro tipo de péptido. Al igual que las HATs, las HDACs se clasifican de acuerdo a la similitud entre sus secuencias (región catalítica de 275 amino ácidos con dominio Rossmann plegado)¹⁵ y los cofactores de los que dependen para llevar a cabo su acción enzimática; el análisis de estos elementos ha derivado en la separación de las HDACs en dos familias que a su vez engloban cuatro clases de desacetilasas. La primera familia de HDACs es la clásica donde se encuentran las HDACs que son dependientes de zinc: HDACs clase I, clase II y clase IV^{10,16}.

Existe otra familia dentro del grupo de las HDACs que es dependiente de NAD⁺. Esta familia es la denominada clase III, también nombrada familia de las sirtuinas¹⁷, que en mamíferos está compuesta por siete miembros (SIRT1-SIRT7).

Diferencias en el cofactor utilizado también implica diferencias en la reacción de desacetilación; mientras que las HDACs clase I, II y IV catalizan una reacción que involucra H₂O y genera acetato como producto de la desacetilación, las desacetilasas clase III generan O-Acetil ADP ribosa y Nicotinamida (Figura 4).

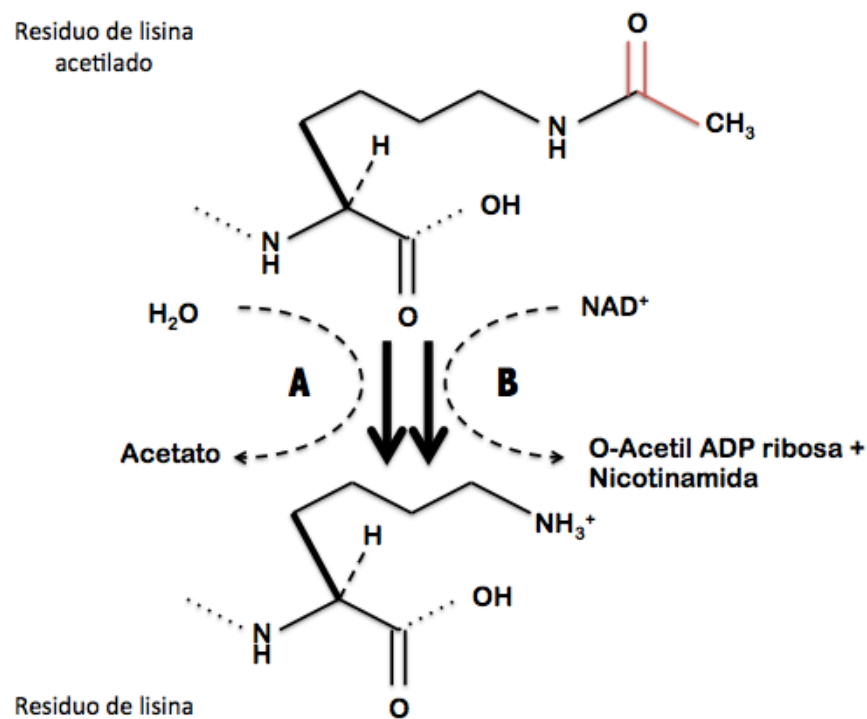


Figura 4. Reacción de desacetilación mediado por las HDACs. A: Reacción llevada a cabo por las HDACs clase I,II y IV. B: Reacción llevada a cabo por las HDACs clase III

Además de diferencias en sus secuencias y cofactores, las HDACs se pueden distinguir debido a los blancos sobre los que actúan, su localización y los procesos en los que participan. Por ejemplo, mientras que las HDAC clase I se expresan de manera ubicua en la mayoría de los tipos celulares, las HDACs clase II tienen un patrón de expresión más restringido que se acota a procesos de diferenciación y desarrollo¹⁶. Por otro lado, la diversidad funcional de las sirtuinas se ve ejemplificada cuando se toman en cuenta las diferencias bien establecidas en su localización celular (Tabla 1).

Tabla 1. Familias de HDACs

FAMILIA	CLASE	ENZIMAS	LOCALIZACIÓN CELULAR
Clásica	I	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8	Núcleo Núcleo Núcleo Núcleo
	II	HDAC4 HDAC5 HDAC6 HDAC7 HDAC9 HDAC10	Núcleo/Citoplasma Núcleo/Citoplasma Citoplasma Núcleo/Citoplasma Núcleo/Citoplasma Núcleo/Citoplasma
	IV	HDAC11	Núcleo
Sirtuinas	III	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7	Núcleo/Citoplasma Núcleo/Citoplasma Mitocondria Mitocondria Mitocondria Núcleo Nucléolo

A pesar de que en mamíferos hay 7 proteínas tipo sirtuina, SIRT1 es el miembro mejor caracterizado de esta familia de desacetilasas. En gran parte, esto se debe a que es la proteína cuya función está más vinculada al desarrollo de patologías como cáncer y neurodegeneración. SIRT1 es una de las desacetilasas de H3K9ac y H4K16ac más importantes^{2,11}, lo que explica el hecho de que esta HDAC tenga un papel preponderante en la coordinación de la formación de heterocromatina tanto facultativa como constitutiva^{18,19}.

Además, en adición a su rol como reguladora de la cromatina, SIRT1 también resulta de gran interés por su papel en la respuesta al estrés energético y la correlación positiva que existe entre la actividad de esta proteína y la longevidad de los organismos.

SIRT1 y su papel como sensor metabólico

La regulación del metabolismo celular requiere que se mantenga un equilibrio delicado entre la obtención de energía, su utilización y almacenamiento²⁰. Lo anterior es posible gracias a que a lo largo del proceso evolutivo se han desarrollado programas metabólicos complejos que desempeñan el papel de coordinadores metabólicos. Para que dichos mecanismos de regulación metabólica funcionen es imprescindible la presencia de sensores metabólicos; estos sensores son moléculas capaces de detectar cambios en el estado energético celular e inducir una respuesta tanto enzimática como transcripcional que permita a la célula adaptarse a las nuevas condiciones metabólicas a fin de mantener la homeostasis celular.

Por ejemplo, la acción catalítica de SIRT1 es NAD^+ dependiente y por esta razón se le considera un sensor metabólico. El índice NAD^+/NADH se considera un indicador del estado energético celular debido a la relación directa que existe entre éste y los flujos catabólicos, particularmente a través del estado Redox celular.^{21,22} Cabe mencionar que, a pesar de que todas las desacetilasas del grupo de las sirtuinas son dependientes de NAD^+ y por lo tanto pueden responder a cambios en el metabolismo, el sensor metabólico por excelencia es SIRT1. En parte esto se debe a la alta afinidad que tiene esta sirtuina por NAD^+ (K_m de ~150 a $200\mu\text{M}$)²³; la cual permite que SIRT1 pueda detectar cambios sutiles en la relación NAD^+/NADH .

Condiciones de estrés energético, como la carencia de energía asociada a condiciones de inanición, generan un aumento en los niveles intracelulares de NAD^+ , esto a su vez induce un incremento en la actividad de SIRT1 que activa mecanismos de adaptación que favorecen la producción de energía²². La adaptación a dichas condiciones de estrés se logra mediante dos vías que actúan de manera complementaria: la primera es la acción directa de SIRT1 sobre la cromatina al favorecer un ambiente compacto que reprime la transcripción mientras que la segunda vía tiene que ver con la interacción de esta desacetilasa con otros reguladores metabólicos como PPAR γ , FOXO1 y PGC-1 α ²⁴⁻²⁶.

El rol de SIRT1 como sensor metabólico implica que la función de esta enzima es altamente dependiente de condiciones ambientales como el tipo de dieta consumida. Por este motivo, la manera en que diferentes tipos de dietas afecta la función de SIRT1 es un tema ampliamente estudiado. Está bien establecido que los hábitos alimenticios causan alteraciones en distintos tejidos pero los mecanismos moleculares a partir de los cuales se generan estos cambios no están del todo descritos; el estudio de SIRT1 abre la posibilidad de describir los procesos intermedios que vinculan el consumo de distintos tipos de dietas y los efectos de éstas sobre el organismo .

Principalmente se han estudiado dos tipos de dietas con relación a SIRT1: la primera es una dieta de restricción calórica (CR por sus siglas en inglés) cuyo propósito es disminuir el consumo calórico a un valor igual o menor al 50% del consumo calórico correspondiente a una dieta promedio²⁷; el segundo tipo de dieta es la denominada dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés) la cual consiste en que de la energía total obtenida un valor igual o mayor al 60% provenga de las grasas²⁸.

En el caso de la restricción calórica, diversos estudios han comprobado que este tipo de dietas aumentan la longevidad de distintos tipos de organismos como levaduras, gusanos, moscas, monos y humanos^{17,20,21,29,30}. Se propone que lo anterior se debe a que la restricción calórica retrasa, y en algunos casos previene, la aparición de enfermedades y patologías asociadas al envejecimiento como cáncer, obesidad, diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedades cardiovasculares³¹. Además, se conoce que la concentración de NAD⁺ celular aumenta con este tipo de dietas³², implicando a SIRT1 en los efectos benéficos asociados a la CR. Esta hipótesis es sustentada por trabajos en los que se observa que la CR se acompaña por un incremento en los niveles de SIRT1 en distintos tejidos³³⁻³⁵.

Por otro lado, se ha reportado que cuando se bloquea la función de SIRT1, los efectos benéficos de estas dietas se dejan de observar^{36,37}.

En lo que concierne a las dietas HFD, estas se asocian a una alta prevalencia de enfermedades como las cardiovasculares, cáncer, diabetes tipo II y enfermedades neurodegenerativas como EA^{28,38}. Esto hace que el consumo de estas dietas se considere como factor de riesgo.

El efecto de estas dietas sobre el metabolismo es contrario al de la CR: se tiene reportado que este tipo de dietas hipercalóricas disminuye el índice $NAD^+/NADH$ ³⁹, lo que repercute de manera negativa sobre la actividad de SIRT1 y afecta la regulación mediada por esta enzima de procesos de sobrevivencia, reparación, proliferación y metabolismo celular. (Figura 5).

Las HFD tienen un efecto negativo sobre SIRT1, que deriva en la disminución de la actividad y niveles proteícos de esta HDAC^{40,41}. Se propone que una disminución en la actividad de SIRT1 se asocia con los efectos que estas dietas tienen sobre la salud debido a que estrategias dirigidas a aumentar la actividad de SIRT1 protegen contra el daño metabólico causado por las HFD⁴²⁻⁴⁵.

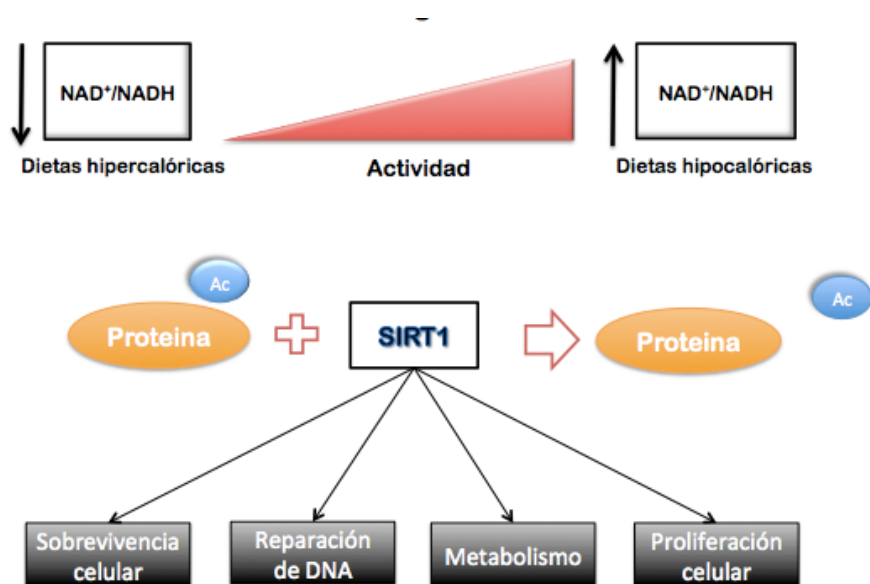


Figura 5. SIRT1 y su relación con el estado metabólico celular. La actividad de SIRT1 depende del estado metabólico de la célula representado por el índice $NAD^+/NADH$. Cuando éste disminuye, como ocurre en las dietas hipercalóricas, la actividad de SIRT1 se reduce. Cuando el índice aumenta, como en el caso de dietas hipocalóricas, la actividad de SIRT1 incrementa. A su vez estos cambios en la actividad de SIRT1 dependientes de los niveles energéticos tienen un efecto sobre procesos regulados por esta HDAC como la sobrevivencia celular, reparación del DNA, metabolismo y proliferación.

SIRT1 y el sistema nervioso central

La presencia de SIRT1 es prominente en tejidos con una alta actividad metabólica como lo son el hígado, páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo y el sistema nervioso central (SNC)⁴⁶. Generalmente, la presencia de esta enzima en dichos tejidos está relacionada con la regulación de procesos metabólicos como la glucólisis, gluconeogénesis y lipólisis⁴⁷. Sin embargo, en el SNC, la función de SIRT1 está más relacionada con promover la salud neuronal. Se tiene reportado que su sobreexpresión favorece el crecimiento de neuritas, la ramificación de dendritas y la densidad de sus espinas, así como la supervivencia celular⁴⁸⁻⁵⁰.

Por otro lado, SIRT1 también se relaciona con padecimientos neurodegenerativos como la EA ya que se asocia a la prevención de la aparición de marcadores bioquímicos característicos de esta enfermedad⁵⁰. Por ejemplo, esta enzima puede desacetilar el factor transcripcional RAR- β (Receptor de ácido retinoico), lo que incrementa la expresión de ADAM10, la enzima encargada del procesamiento no amiloidogénico de la APP (proteína precursora del amiloide)¹⁷. En adición, SIRT1 también es responsable de desacetilar tau; lo que facilita la degradación de dicha proteína previniendo que su forma fosforilada se acumule y forme marañas neurofibrilares⁵¹. En conjunto, estas evidencias son de gran importancia ya que indican la existencia de una relación causal entre la función de SIRT1, que depende del estado metabólico, y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Ácido palmítico y su papel como componente de las HFD

El cerebro tiene un alto requerimiento energético; a pesar de que este órgano sólo corresponde al 2% de la masa corporal se le puede atribuir el consumo de aproximadamente el 20% de la energía total utilizada por el organismo⁵². Por este motivo, el cerebro es particularmente sensible a cambios en el estado metabólico como los que se dan cuando se consumen HFD. Existen estudios que demuestran que el consumo de dietas altas en grasa tiene un efecto directo sobre la función del encéfalo, vinculando el consumo de dietas ricas en ácidos grasos saturados con el desarrollo de déficits cognitivos y un riesgo aumentado de padecer enfermedades neurodegenerativas^{38,53-56}.

Posiblemente, dichos efectos son consecuencia de cambios inducidos por este tipo de dietas como alteraciones estructurales, desarrollo de resistencia a la insulina, pérdida de peso, disminución de arborizaciones dendríticas e inestabilidad sináptica⁵⁷.

Curiosamente, muchos de estas alteraciones son replicables cuando en lugar de utilizar HFD lo que se usa son componentes de estas dietas como los ácidos grasos saturados, sugiriendo que algunos compuestos son más importantes que otros en la generación de estas alteraciones metabólicas asociadas a efectos cognitivos. El compuesto al que se le han atribuido gran parte de los cambios bioquímicos observados en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* expuestos a estas dietas es el ácido palmítico (AP). El AP es un ácido graso saturado de cadena larga compuesto por 16 carbonos (Figura 6) que de manera natural está presente en el aceite de palma, leche, carne, mantequilla y queso.

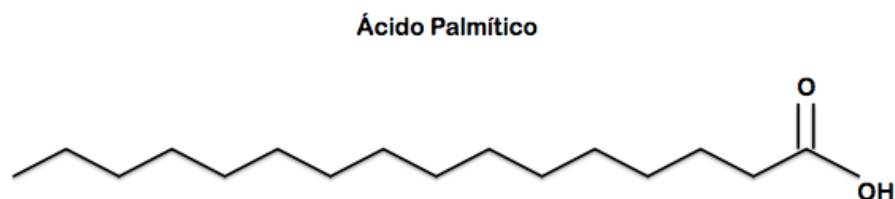


Figura 6. Estructura química del ácido palmítico un ácido graso saturado de 16 carbonos.

El AP es un elemento importante de la dieta humana ya que el aceite de palma, constituido en un 44% por ácido palmítico, representa el 32% de la producción global de grasas y aceites. Su demanda es alta debido a que se utiliza como aditivo para alimentos, por ejemplo frituras, dulces, análogos de queso, alimentos horneados, helado, chocolate, alimentos congelados (pizza, pay, etc.), fideos, avenas, margarinas, vitaminas y suplementos alimenticios⁵⁸.

Evidencia reciente del laboratorio demuestra que cultivos primarios de neuronas de hipocampo expuestos a AP presentan una disminución del índice $NAD^+/NADH$; mismo que se asocia a una disminución en los niveles y actividad de SIRT1 reflejada por el aumento en la acetilación de la lisina 310 de la subunidad p65 de la familia proteica NF- κ B, una molécula regulada por SIRT1, que al desacetilarse se inhibe al promoverse su degradación vía proteosoma⁵⁹.

En adición, los niveles de BACE-1, una proteína clave en la ruta amiloidogénica están elevados⁶⁰. Los resultados anteriores sugieren que el ácido palmítico genera alteraciones en el metabolismo neuronal que inducen cambios en proteínas asociadas a la inflamación (NF- κ B) y la aparición de un marcador asociado a la Enfermedad de Alzheimer (BACE-1) y que dichas alteraciones están asociadas a una reducción en la actividad de SIRT1 (Flores-León, M., 2016). Cabe mencionar que a pesar de haber una gran cantidad de evidencias sobre los efectos de los ácidos grasos saturados en la actividad y niveles de SIRT1, no se ha explorado el efecto que esta disminución tiene sobre blancos histónicos de esta desacetilasa como H3K9ac, lo que resulta de gran importancia ya que podría ayudar a vincular alteraciones en el estado energético celular inducidas por la exposición a AP con los cambios a nivel molecular observados como consecuencia de dicha alteración.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingesta de dietas altas en grasa o componentes de ésta como el ácido palmítico produce alteraciones en la función metabólica neuronal que se asocian a una reducción en la actividad de SIRT1. Sin embargo, se desconoce si el desbalance en la relación NAD^+/NADH inducido por ácido palmítico, uno de los componentes más abundantes en las dietas altas en grasa, pudiera tener un efecto en las modificaciones post-traduccionales de histonas que son reguladas por la actividad de SIRT1 en neuronas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición a ácido palmítico genera cambios en los niveles de H3K9ac via una disminución en la actividad de SIRT1?

HIPÓTESIS

El ácido palmítico modifica los niveles de H3K9ac debido a que disminuye la función de SIRT1.

OBJETIVO GENERAL

Analizar cambios en los niveles de SIRT1 y la modificación post-traducciona H3K9ac después de una exposición a ácido palmítico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la incorporación del ácido palmítico al interior de las neuronas diferenciadas de neuroblastoma humano.
- Caracterizar los cambios en los niveles proteicos de SIRT1 tras una exposición a ácido palmítico.
- Analizar el cambio en los niveles de H3K9ac a diferentes tiempos de exposición de ácido palmítico

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano MSN (Reynolds et al., 1986) y se indujo una diferenciación a neuronas maduras. Las células se sembraron a una confluencia de 50×10^3 células por pozo. El proceso de diferenciación fue el siguiente: Una vez sembradas las células se dejan incubar a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 24 horas en medio condicionado RPMI 1640 (Gibco®). Después de las 24 horas de incubación se retira el medio condicionado y se sustituye por medio de diferenciación RPMI 1640 +NGF+ácido retinoico (Tabla 2). Las células se dejan diferenciar por 5 días en una incubadora a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂ (Figura 7).

Al sexto día se observa la morfología de las células en cultivo con un microscopio óptico de campo claro ZEISS® Axiovert25 para verificar la integridad de los cultivos y la correcta diferenciación de estos.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo condicionado	Medio de diferenciación
<ul style="list-style-type: none">• RPMI 1640 1X (Gibco®)• L-glutamina 10mM• Serina 47mM• Asparagina 38mM• Suero Fetal Bovino 10%• Aminoácidos no esenciales 10%	<ul style="list-style-type: none">• RPMI 1640 1X (Gibco®)• L-glutamina 10mM• Serina 47mM• Asparagina 38mM• Suero Fetal Bovino 10%• Aminoácidos no esenciales 10%• NGF 50 ng/μl• Ácido retinoico 5μM

Tratamiento con ácido palmítico

Una vez terminado el proceso de diferenciación, las células fueron tratadas con AP a concentraciones de 200 μM y 300 μM . El AP se prepara al momento a partir de una solución 200mM de AP en etanol al 100% de la cual se toma el volumen necesario para preparar una solución 5mM de AP en PBS/BSA 10%. La solución se deja incubando en baño maría a 37°C hasta que el AP se disuelva por completo. A las células diferenciadas se les retira el medio, se mezcla y se vuelve a aplicar a un volumen definido e igual para todos los pozos. Una vez disuelto, el AP se agrega a los cultivos celulares en los volúmenes necesarios para que quede a una concentración final de 200 μM o 300 μM . Posteriormente, las células se vuelven a incubar por un máximo de 24 horas después de las cuales se realizan ensayos de MTT, Western- Blot, tinción de rojo oleoso e inmunofluorescencia según sea el caso. En el caso del rojo oleoso, se analiza un segundo grupo experimental que corresponde a células a las cuales , después de ser expuestas por 24 horas a AP, se les remueve el medio con tratamiento y se incuban por 24 horas adicionales en medio condicionado (Figura 7).

Modelo experimental: Neuronas diferenciadas a partir de una línea celular de neuroblastoma humano (MSN).
Grupos experimentales:

- Grupo 1: Exposición a AP por 24 horas.
- Grupo 2: Exposición a AP por 24 horas, remoción del medio con AP e incubación posterior por 24 horas con medio condicionado sin AP.

Tratamientos: Ácido palmítico en concentraciones de 200 μM o 300 μM .

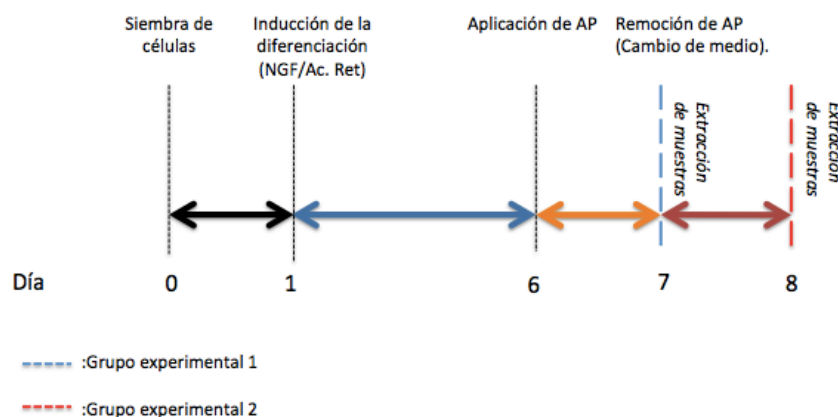


Figura 7. Diseño experimental seguido para los tratamientos con AP. Las células sembradas en el día 0 se incuban por 24 horas, al término de las cuales son diferenciadas al incubarlas con medio RPMI+NGF+Ac. Ret por 5 días. Posteriormente, las células son tratadas con AP a concentraciones de 200 μM y 300 μM de AP hasta por 24 horas. En el caso del grupo experimental 2 las células expuestas al ácido graso se incubaron por 24 horas adicionales en un medio condicionado sin el ácido graso.

Ensayos de reducción de MTT

Para realizar los ensayos de viabilidad neuronal y actividad metabólica, se realizó la prueba de reducción de MTT. Las células se incuban con una solución de MTT (5mg/ml en PBS) en una proporción 1:10 con respecto al volumen del medio y se incuban por 45 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se les retira el medio y los cristales de formazan generados se solubilizan mediante la adición de 800 µM de isopropanol ácido (4% de HCl 1N en isopropanol al 100%) por pozo. Una vez disueltos los cristales, se toman muestras de 200 µl de cada pozo por duplicado y se colocan en una placa de ELISA para su lectura a 535nm en un espectrofotómetro (BioRad® Microplate reader Modelo 550).

Western Blot

Para el análisis de proteínas mediante Western Blot, la extracción de proteínas de los cultivos celulares se realizó con buffer de lisis RIPA (Tabla 3). De manera resumida la extracción se realiza de la siguiente manera, se remueve el medio de cultivo, las células se lavan 3 veces con PBS frío, después del tercer lavado se agrega el buffer RIPA y se raspan las células con un “scraper”. Se recupera el volumen de extracción y se coloca en un tubo eppendorf de 1 ml conservado en hielo. Se vuelve a agregar un volumen menor o igual de buffer RIPA para recuperar aquello que se haya quedado y se recupera en el tubo eppendorf con el resto de la muestra. La muestra se sónica tres veces con pulsos de 10 segundos con una amplitud de 30 con el procesador ultrasónico Vibracell, SONICS® y se conservan a -20 °C para su posterior análisis.

Tabla 3. Composición de Buffer RIPA

Buffer de lisis RIPA
<ul style="list-style-type: none">• 50 mM Tris HCl• 150 mM NaCl• 1% Nonident P40• 0.5% Deoxicolato• Coctel de inhibidores (complete®, Roche)

Cuantificación de proteínas

Las muestras se cuantificaron mediante el método de Lowry modificado utilizando el kit de cuantificación de proteínas Bio-Rad DC® siguiendo las instrucciones del proveedor.

Electroforesis de las muestras

Se realizó un SDS-PAGE para la detección de las proteínas de interés (Tabla 4). Las histonas se corrieron en geles de poliacrilamida de 1.5mm de grosor a una concentración de 16% y con una corriente de 200V por aproximadamente una hora. Los geles correspondientes a SIRT1 tenían un grosor de 1.5mm y una concentración del 10% de poliacrilamida. Estos geles se corrieron a 150V por aproximadamente hora y media.

Tabla 4. Composición de geles de electroforesis

Gel de poliacrilamida al 10% de 1.5mm de grosor	Gel de poliacrilamida al 16% de 1.5mm de grosor
<p><u>Separador:</u></p> <p>Acrilamida 30%-bis 0.8%: 33.8%</p> <p>Tris 1.5M pH 8.8: 25.5%</p> <p>H₂O: 40.39%</p> <p>APS 10%: 0.3%</p> <p>TEMED: 0.07%</p> <p><u>Concentrador:</u></p> <p>Acrilamida 30% -bis 0.8%: 16.7%</p> <p>Tris 1.5M pH 8.8: 25.05%</p> <p>H₂O: 57.6%</p> <p>APS 10%: 0.5%</p> <p>TEMED: 0.17%</p>	<p><u>Separador:</u></p> <p>Acrilamida 30% -bis 0.8%: 53%</p> <p>Tris 1.5M pH 8.8: 24.86%</p> <p>H₂O: 21.6%</p> <p>APS 10%: 0.5%</p> <p>TEMED: 0.05%</p> <p><u>Concentrador:</u></p> <p>Acrilamida 30% -bis 0.8%: 11.55%</p> <p>Tris 1.5M pH 8.8: 28.9% H₂O: 58.9%</p> <p>APS 10%: 0.58%</p> <p>TEMED: 0.12%</p>

Transferencia de la proteína

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot® LV PVDF BioRad) previamente hidratadas con metanol y estabilizadas en Buffer de Transferencia Towin sin SDS (Tabla 5). La transferencia se realizó en una cámara húmeda con amperaje constante.

Tabla 5. Composición de buffer Towin

Buffer de transferencia húmeda
25mM de tris base
192mM de glicina
Agua destilada
Metanol al 20%

Incubación y detección con anticuerpos

Previo a la incubación del anticuerpo primario, las membranas fueron bloqueadas con BSA 5% en TBS Tween al 0.1% (TBST). Los anticuerpos primarios (Ver ANEXO I) de H3 (Sigma®), H3K9ac (Abcam®), SIRT1 (Abcam®) y β -actina (Sigma®) se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubaron los anticuerpos secundarios (Ver ANEXO II) Anti-Rabbit HRP IgG (SantaCruz) y Anti-Mouse HRP IgG (Invitrogen) por dos horas a temperatura ambiente en agitación lenta. Se realizaron tres lavados con TBS-T una vez terminado el tiempo de incubación. Para la inmunodetección, se incubó la membrana con el kit de quimioluminiscencia Millipore® Immobilon Western y se utilizaron placas fotográficas Carestream® Kodak® Biomax® Standard-Chemiluminescent.

Análisis de Densitometrías

La densitometría de las placas se realizó utilizando el software ImageJ®. Para el análisis de SIRT1 se realizó una normalización contra la β -actina. Mientras que para el análisis de la H3K9ac se realizó una doble normalización, primero la H3 total y la H3K9ac se normalizaron contra la β -actina y posteriormente los índices resultantes se normalizaron entre si (H3K9ac /H3 total).

Tinción de rojo oleoso

La detección de los cuerpos lipídicos se hizo mediante el protocolo de tinción de rojo oleoso; Oil Red O (Sigma®). Se prepara la solución de trabajo agregando 5% de Oil Red O en isopropanol y se mantiene en agitación constante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se filtra la solución con papel Whatmann®, se prepara una solución 6:4 (Rojo oleoso/Agua Milli-Q®) y se deja incubando la solución a temperatura ambiente hasta su uso inmediato. Antes de utilizarla se filtra con un filtro de pirinolo con poros de 0.20 micras. Para la tinción, se remueve el medio de los cultivos celulares y se realizan dos lavados con PBS, se fijan las células mediante la adición de PFA al 4% en PBS, las células se dejan incubando una hora a temperatura ambiente. A continuación, se remueve el PFA al 4%, se realiza un lavado con PBS y un lavado con isopropanol al 60%. Posteriormente, se remueve el isopropanol y se dejan secar las células. Una vez secas, se agrega la solución de rojo oleoso y se incuban las células por dos horas. Finalmente, se remueve la solución de rojo oleoso y se lavan las células con agua destilada tres veces o hasta quitar el fondo. Para su cuantificación, se agrega isopropanol al 100% y se deja solubilizar 20 minutos en agitación. Se recuperan volúmenes de 200 µl de cada pozo por duplicado y se colocan en una placa ELISA para su lectura a 520nm en el espectrofotómetro. (BioRad® Microplate reader Modelo 550).

Inmunofluorescencia

Se realizó un análisis por inmunofluorescencia para visualizar cambios en H3K9ac. Para esto, primero se remueve el medio de cultivo de los pozos y se fijan las células mediante la adición de PFA 2% en PBS 1X por 10 minutos. Posteriormente, se remueve el PFA 2% y se realizan tres lavados con PBS 1X; los lavados son de 5 minutos cada uno y en agitación. Las células se permeabilizan con Tritón al 0.1% en PBS 1X por 10 minutos, al término de los cuales, se remueve el Tritón al 0.1% y se le dan dos lavados rápidos a las células. Se bloquea 1 hora con PBS/Albumina 0.1%/ Tritón 0.1% y después se incuban las células con anticuerpo primario (H3K9ac) en PBS/ Albumina 0.1%/ Tritón 0.1% toda la noche a -4 °C. Una vez concluido el periodo de incubación se remueve el anticuerpo y se realizan tres lavados con PBS 1X; los lavados son de 5 minutos cada uno en agitación.

Se agrega el anticuerpo secundario (Alexa 488) y se deja incubar por 1 hora a temperatura ambiente evitando exponer a la luz las células. Ya que se incubó el anticuerpo secundario, éste se retira y se adiciona el rojo radiante (Bio-Rad®) a una concentración de 1:15,000 en PBS, dejar incubar por 10 minutos. En este punto se montan los cubreobjetos con medio de montaje Dako® y se sellan los bordes con barniz de uñas. Las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus IX70 a un aumento de 60X.

La inmunofluorescencia promedio de las células se evaluó mediante análisis realizados en el software ImageJ. Se delimitaron los contornos de los núcleos con la herramienta ROI manager y se determinó la intensidad promedio de dicha área. Por n se analizaron 100 células.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad PRISM® versión 6.0. El valor de alfa se tomó como 0.5. Para la gráfica de la viabilidad celular se realizó ANOVA de una vía con un análisis múltiple corregido (Holm-Sidak). La gráfica de SIRT1 se analizó con ANOVA de una vía con un análisis múltiple corregido (Holm-Sidak). La gráfica de los niveles de H3K9ac a 200 μ M y 300 μ M de AP se analizó con ANOVA de una vía con un análisis múltiple corregido (Holm-Sidak). La comparación entre las intensidades de inmunofluorescencias se hizo con t de student. Los resultados del rojo oleoso se analizaron con ANOVA de una vía con un análisis múltiple corregido (Holm-Sidak). La curva de tiempo de H3K9ac se analizó con ANOVA de dos vías y análisis múltiple (Prueba de Fisher LSD).

RESULTADOS

Evaluación de la viabilidad celular de cultivos de neuroblastoma humano diferenciado (MSN) tratados con AP.

Se realizaron ensayos de reducción de MTT para determinar si los tratamientos de AP afectaban la viabilidad celular de los cultivos de neuroblastoma humano diferenciado (MSN). Previamente a la prueba colorimétrica, los cultivos fueron tratados con dos concentraciones diferentes de AP, 200 μM o 300 μM , y las células correspondientes a la condición control fueron tratadas con el vehículo (BSA 10% en PBS). A un grupo experimental se le realizó el ensayo 24 horas después de aplicar los tratamientos con AP mientras que al segundo, después de 24 horas de exposición al AP, se les removió el medio y se incubó 24 horas con medio condicionado sin AP. Los resultados indican que no existen diferencias significativas de la viabilidad entre condiciones y que ésta no decrece más allá del 80% en relación a la condición control (Figura 8). A partir de esto se concluye que las concentraciones a las que se está utilizando el AP no resultan citotóxicas para las células y que el cambio de un medio con AP por un medio condicionado sin este ácido graso tampoco afecta su viabilidad.

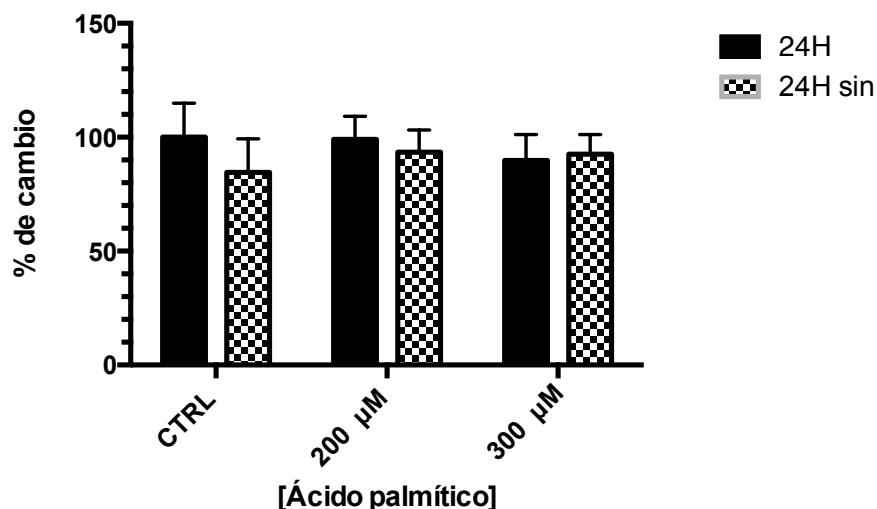


Figura 8. Determinación de la viabilidad celular en condiciones CTRL, 200 μM y 300 μM de AP tras 24H de exposición (24H) y 24H sin AP posterior a una exposición por 24H (24H sin). El porcentaje de cambio se calculó considerando a la absorbancia media del CTRL 24H como el 100% (n=6). Los valores representados son la media \pm ES.

Análisis de la incorporación del AP por parte de las células.

Las neuronas utilizan a la glucosa como sustrato energético de manera casi exclusiva⁵². Si bien es cierto que los ácido grasos pueden atravesar la barrera hematoencefálica^{61,62} y existe evidencia de que estos son oxidados en el cerebro⁶³⁻⁶⁵, el conocimiento actual indica que el metabolismo de lípidos es una actividad realizada preferencialmente por los astrocitos⁶⁶. Por esta razón, para comprobar si las neuronas son capaces de incorporar el AP, se realizaron tinciones de rojo oleoso con el fin de cuantificar los cuerpos lipídicos de las células. Se realizó la tinción para las tres condiciones experimentales; CTRL, AP 200 μ M y 300 μ M. En adición, para determinar si la célula era capaz de metabolizar los lípidos incorporados se realizó el ensayo de rojo oleoso en cultivos a los que se les removió el AP para después ser incubados por 24 horas con medio condicionado sin AP. Los resultados demuestran que el AP induce un incremento en la cantidad de cuerpos lipídicos y que tras una exposición a medio sin AP se disminuye hasta los niveles similares a la condición control (Figura 9).

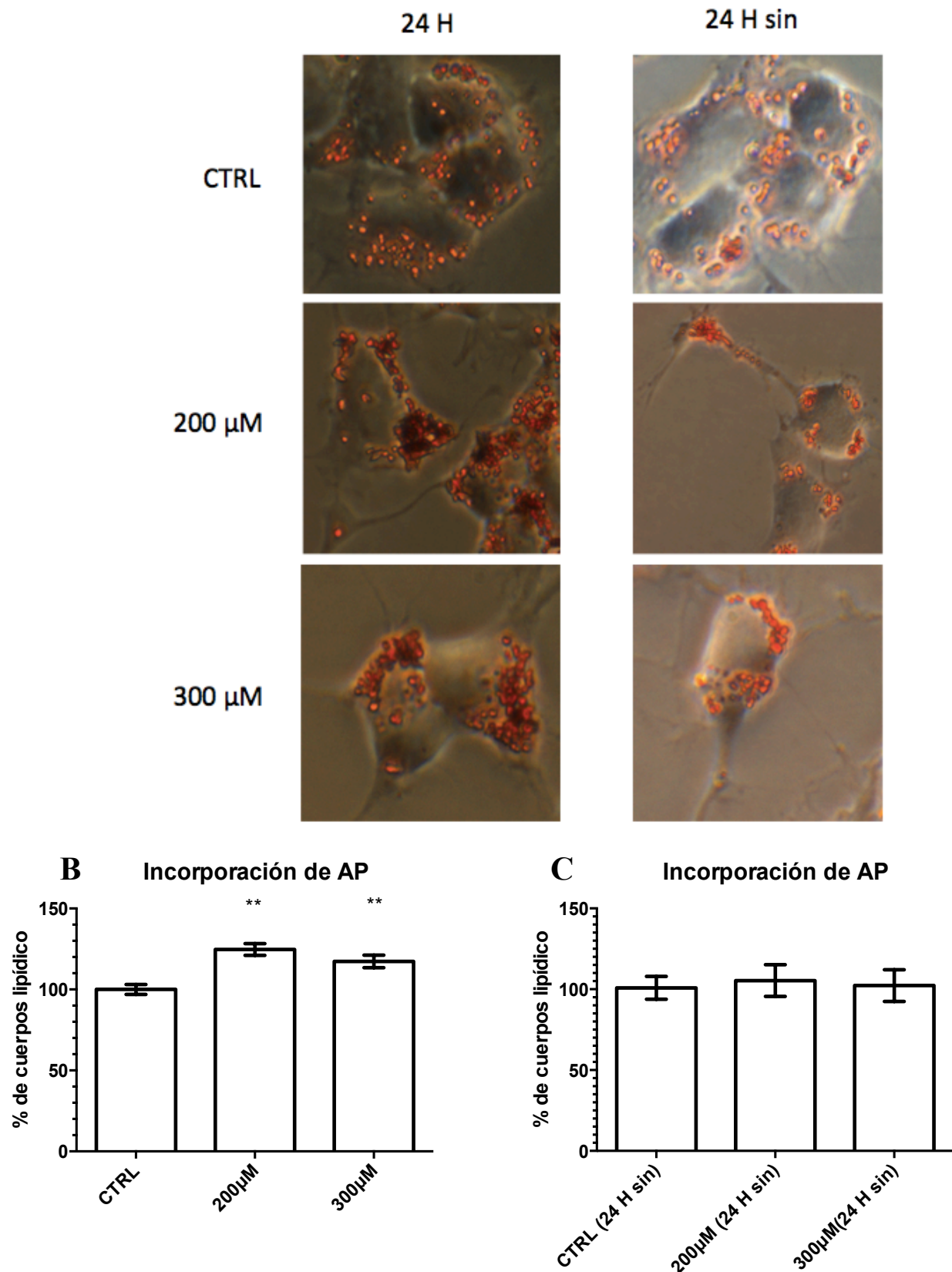


Figura 9. Análisis de la incorporación de AP en los cuerpos lipídicos. A: El AP genera un aumento en el número de cuerpos lipídicos de la célula; imágenes tomadas en contraste de fases Olympus IX70, aumento de 60X. B: Tras 24 horas de exposición en las células tratadas con AP se observa un aumento en el porcentaje de cuerpos lipídicos (n=5). C: Tras remover el AP y volver a incubar por 24H el número de cuerpo lipídicos disminuye a niveles similares de los del CTRL (n=5). Los valores representados son la media \pm ES. * p<0.05.

Determinación de los niveles proteicos de SIRT1.

A fin de establecer si una exposición a AP genera cambios en los niveles de SIRT1, se realizaron ensayos de Western Blot. Se evaluaron tres condiciones: células expuestas a vehículo (CTRL), células expuestas a 200 μM de AP y células expuestas a 300 μM de AP; los tratamientos tuvieron una duración de 24 horas. Observamos que los niveles de SIRT1 no cambian cuando las células son expuestas a 200 μM de AP mientras que con una concentración de 300 μM se reporta una disminución de aproximadamente el 30% en el nivel proteico de SIRT1 (Figura 8).

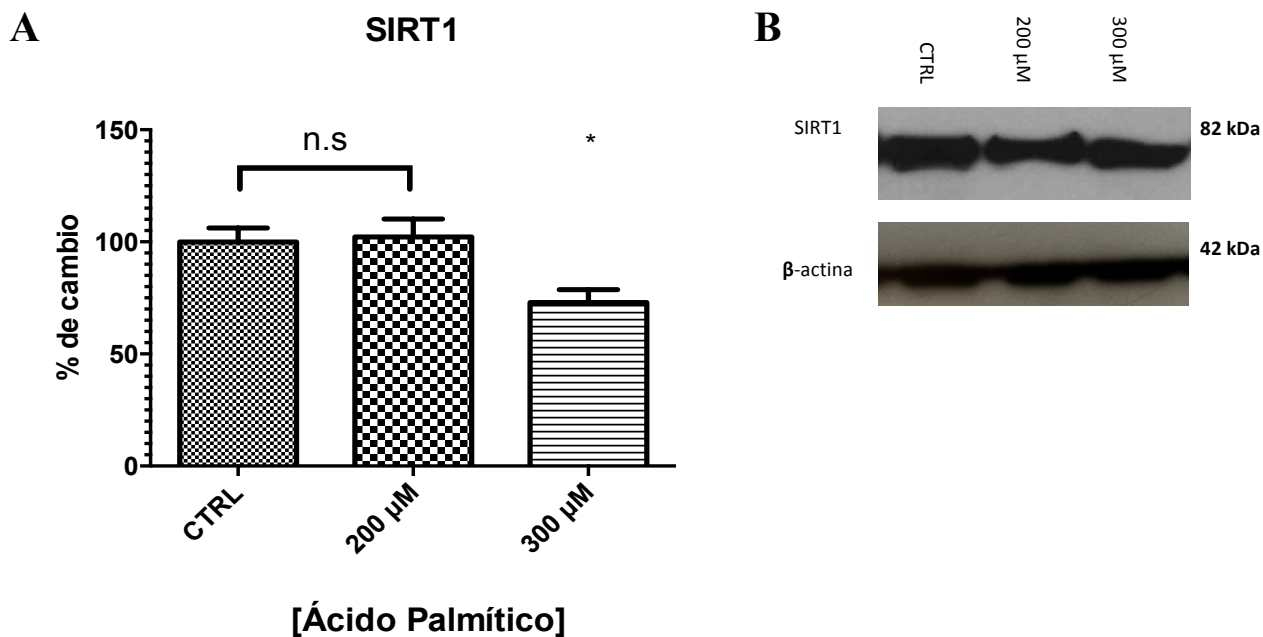


Figura 10. A: Medición del nivel proteico de SIRT1 para las condiciones CTRL, 200 μM y 300 μM de AP (n= 5). Los valores representados son la media \pm ES. * $p < 0.05$. B: Western-Blot representativo.

Evaluación de cambios en el nivel de acetilación de H3K9ac

Una vez establecido que la exposición al AP genera una disminución en los niveles de SIRT1, se buscó analizar el efecto que esta alteración podría estar ejerciendo sobre los niveles de acetilación de un blanco histónico de SIRT1 como la H3K9ac. Se realizaron inmunofluorescencias (Figura 10) y Western-Blots (Figura 11). El western blot se realizó para determinar cambios totales en los niveles de H3K9ac mientras que la inmunofluorescencia se hizo para evaluar si dichos cambios en los niveles también corresponden con un cambio en la distribución de la marca. Tanto la inmunofluorescencia como el western blot indican que el AP induce una reducción en los niveles de acetilación de H3K9ac y, como se puede observa en la Figura 11, dicho efecto es dosis dependiente; a mayor concentración de AP más pronunciada es la reducción. En lo que respecta a la distribución de la marca, las zonas donde hay una disminución más marcada corresponden a la porción central de núcleo en donde se localiza la eucromatina.

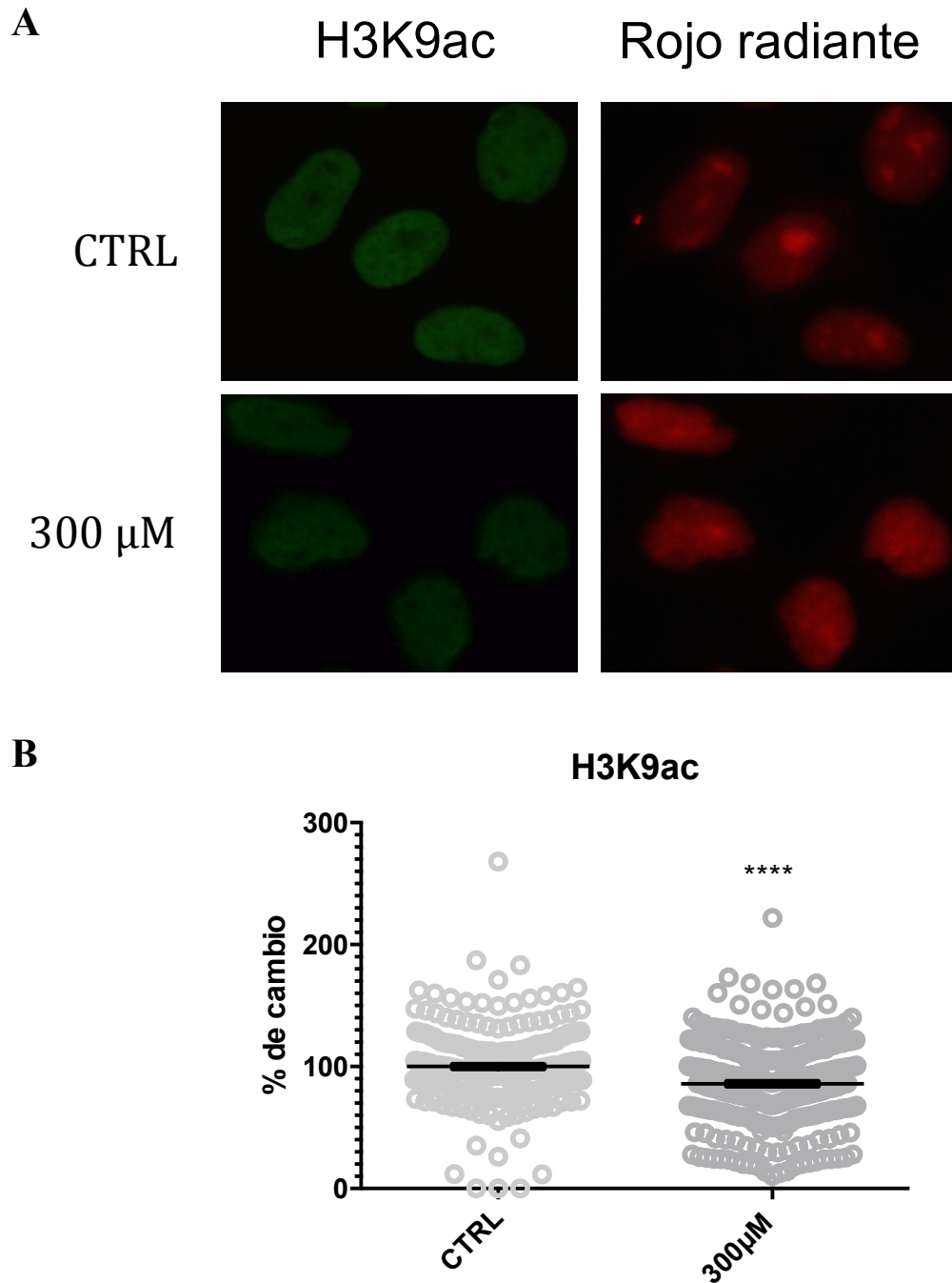


Figura 11. Análisis de la disminución de H3K9ac mediante inmunofluorescencia. Se determinó que el AP genera una disminución en H3K9ac (n=3). A: Imágenes representativas de la disminución de H3K9ac inducida por el AP, en verde se muestra la H3K9ac, en rojo se marca el RNA nuclear. B: Cuantificación del cambio en la intensidad de señal de la marca. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Olympus IX70, aumento de 40X. La intensidad de señal se obtuvo a partir de análisis realizados mediante el software ImageJ, se analizaron 100 células por n. Los valores representados son la media \pm ES. ****p<0.01.

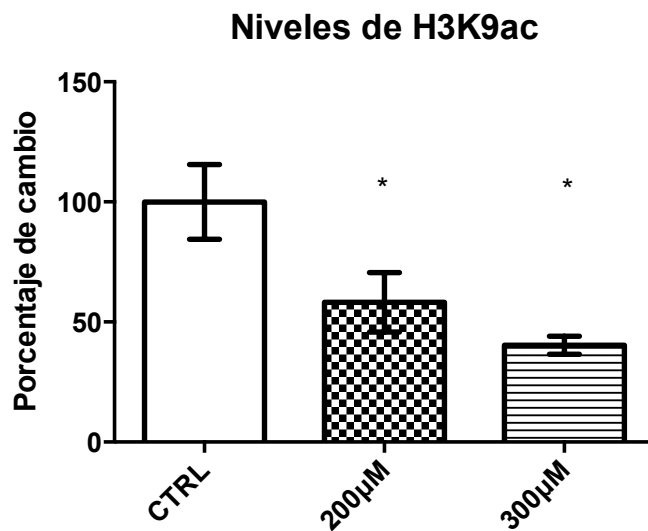
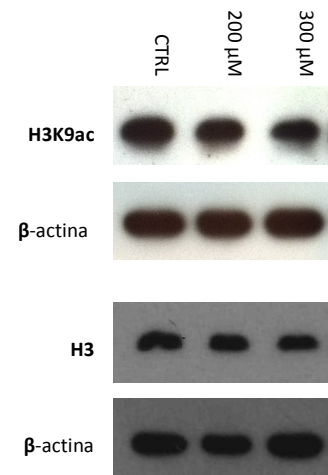
A**B**

Figura 12. Análisis de la disminución de H3K9ac mediante Western-Blot. A: El AP induce una disminución en el nivel de H3K9ac; este efecto es dosis dependiente (n=3). Los valores representados son la media±ES. *p<0.05. B: Western-Blot representativo de la disminución de H3K9ac.

A pesar de que se observa una disminución de la marca a las 24 horas de exposición a AP, la dinámica de las modificaciones post-traduccionales de histonas es altamente fluctuante ante estímulos ambientales. Con el fin de describir cómo es la dinámica de la disminución de la H3K9ac, posterior a tratar a las células con 300 μM de AP, se cuantificó la acetilación a distintos tiempos (3, 6, 12 y 24 horas). Los resultados obtenidos (Figura 12) indican que la disminución observada después de 24 horas de tratamiento es precedida por un aumento en los niveles de la H3K9ac. Este incremento llega a su punto máximo a las 6 horas de exposición después de las cuales se invierte la tendencia y los niveles de H3K9ac comienzan a disminuir hasta a llegar a niveles por debajo de los del control.

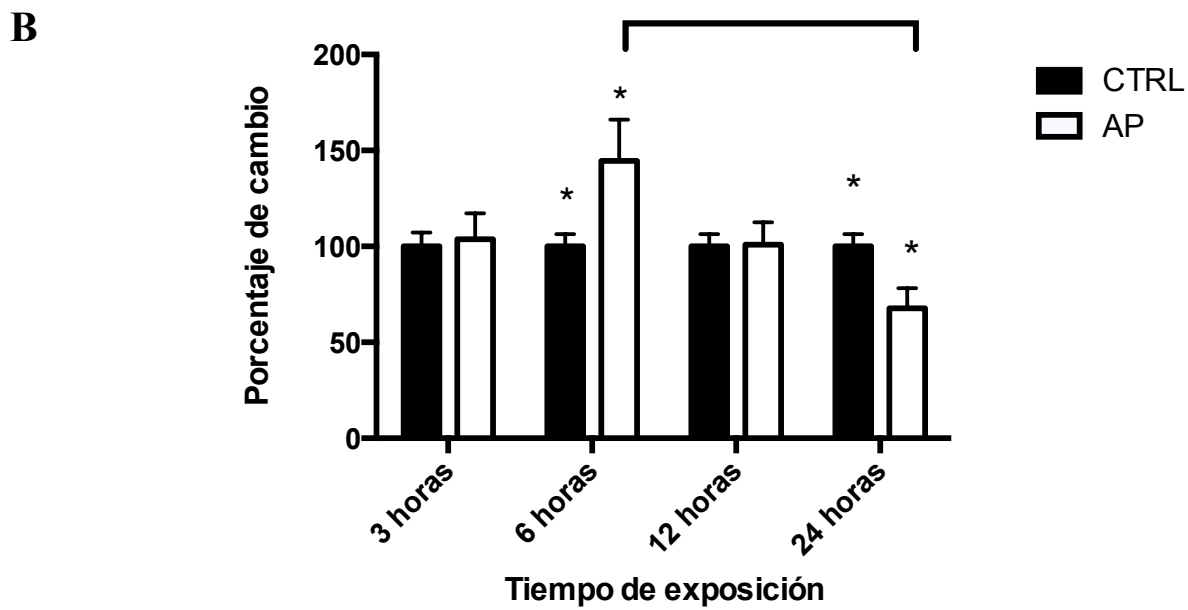
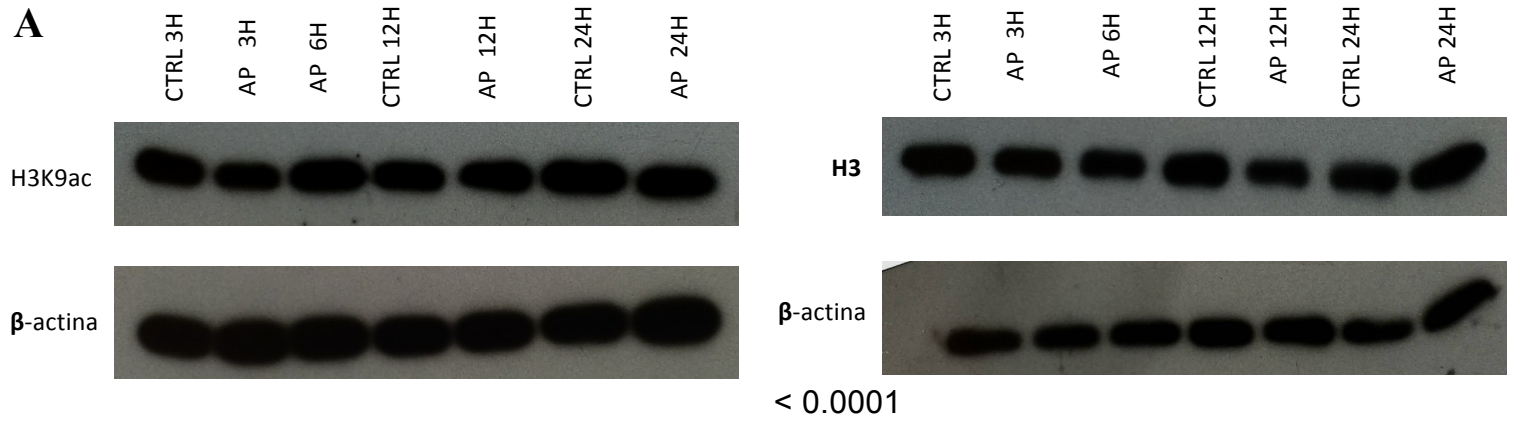


Figura 13. Descripción de la dinámica de cambio de H3K9ac a lo largo del tiempo. A: El AP induce cambios diferenciales en los niveles de H3K9ac: durante las primeras 6 horas de exposición se observa que esta marca aumenta de manera significativa, esta tendencia se invierte a partir de este punto, para las 24 horas de exposición la acetilación de H3K9 ha disminuido a niveles por debajo de los del CTRL (n=6). Los valores representados son la media \pm ES, * $p < 0.05$. B: Western-Blots representativos.

DISCUSIÓN

Uno de los primeros efectos observados con el tratamiento de AP fue el aumento de los cuerpos lipídicos celulares y la disminución de estos posterior a la remoción del medio con el ácido graso. Los cuerpos lipídicos son organelos de una membrana en donde se almacenan lípidos neutros como triglicéridos y colesterol; los cuales son generados a partir de la esterificación de ácidos grasos⁶⁷.

Estos organelos tienen varias funciones, dentro de las que destacan su rol como reservorio de energía, repositorio de elementos estructurales de la membrana celular y sistema de amortiguamiento de la lipotoxicidad^{67,68}. Los resultados obtenidos parecen indicar que las células están incorporando el AP, lo transforman para almacenarlo en cuerpos lipídicos y lo pueden eliminar.

Además de un incremento en el número de cuerpos lipídicos, la tinción de rojo oleoso nos permitió determinar que en células tratadas con AP estos organelos tienden a aglutinarse en lugar de distribuirse alrededor de toda la célula y además parece ser que son transportados a lo largo de algunas neuritas.

Existen evidencias que indican que los cuerpos lipídicos pueden ser transportados de manera activa a lo largo de microtúbulos⁶⁷, se cree que esto permite asegurar la disponibilidad de lípidos en zonas donde son requeridos. En el caso de las neuronas, el desplazamiento de estos organelos sugiere que el AP asimilado por las neuronas está siendo utilizado y no permanece inerte una vez en el interior celular.

Como ya se había demostrado en trabajos previos⁶⁰, el AP generó una disminución en los niveles de SIRT1 y esto a su vez está relacionado con un decremento en el ratio $NAD^+/NADH^+$. Sin embargo, el mecanismo particular a través del cual las alteraciones metabólicas alteran la expresión de SIRT1 todavía no se encuentra esclarecido por completo. Existen evidencias que indican que dicho efecto podría estar relacionado con el papel que SIRT1 juega en mantener la expresión de sí misma: El miR-34a es un microRNA que suprime los niveles de SIRT1 de manera post-transcripcional; la expresión de este miRNA a su vez depende de la actividad del factor transcripcional p53 el cual es desacetilado por SIRT1 lo que inhibe su actividad⁶⁹.

Esto quiere decir que los niveles de SIRT1 son dependientes de la actividad de esta misma proteína ya que de su función depende que p53 sea desacetilado, y por lo tanto inhibido, lo que a su vez impide que la expresión de miR-34a aumente y este elemento sea capaz de interferir con la traducción del mensajero de SIRT1.

En el caso de las células tratadas con AP, la disminución del nivel de SIRT1 podría deberse a que el decremento del ratio $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$ genera una baja en la actividad de esta desacetilasa lo que altera el proceso de retroalimentación positiva que bloquea la acción de p53 y miR34a. El hecho de que a 200 μM no haya cambios en el nivel de SIRT1 puede deberse a que si bien a esta concentración el AP si afecta la actividad de SIRT1, el efecto metabólico no es lo suficientemente profundo como para interferir con el bucle de retroalimentación positiva que mantiene la expresión de esta proteína, algo que si ocurre a una concentración mayor de AP. Por otro lado, las diferencias en el efecto que tiene las distintas concentraciones de AP podrían ser debido a la ventana de tiempo en la que estamos evaluando los cambios, es posible que a 200 μM también se observe una disminución de SIRT1, pero al ser una menor concentración de AP se necesite más tiempo para que se manifieste el efecto.

Dado que la expresión de SIRT1 se ve comprometida con la exposición a AP, uno de los blancos de esta enzima podría indicarnos si su actividad también se encuentra comprometida, este blanco es la H3K9ac, que además está involucrada en la regulación de la actividad transcripcional. La disminución observada en esta marca sugiere que el ácido palmítico podría estar teniendo un efecto sobre la expresión genética puesto que la falta de acetilación promueve el silenciamiento de genes. Sin embargo, análisis más detallados son necesarios para poder hacer esta afirmación ya que la acetilación trabaja en conjunto con otros mecanismos epigenéticos como la metilación de histonas y del DNA; y por lo tanto cómo se ve alterado el programa de expresión depende no solo de cambios en la acetilación sino también de cómo esto influye sobre otros factores epigenéticos.

La disminución de la actividad de SIRT1 se ejemplifica en la curva de tiempo de la figura 12 ya que el aumento en los niveles de H3K9ac observado a las primeras 6 horas de exposición a AP parece respaldar la hipótesis de que éste ácido graso inhibe la actividad de la desacetilasa y por lo tanto blancos como la acetilación de H3K9 aumentan.

Por otro lado, la disminución que se observa en el nivel H3K9ac posterior a las 6 horas de exposición abre la posibilidad de que otras desacetilasas de histonas se estén viendo afectadas de manera contraria por el AP, de tal manera que su actividad se ve aumentada, aunque no se puede descartar que en realidad enzimas HATs están experimentando una actividad reducida y esto es lo que genera la disminución en la acetilación de H3K9ac.

En la literatura se tiene reportado que dietas altas en grasa generan una disminución en los niveles de acetilación global del cerebro de ratas, asimismo, este efecto se puede revertir si los animales son tratados con inhibidores de HDACs clase I y II; lo que concuerda con nuestra propuesta de que el ácido palmítico está induciendo un incremento en la actividad de otras HDACs diferentes a SIRT1⁷⁰. De ser cierto, la HDAC responsable de la reducción de H3K9ac necesariamente debe pertenecer a la clase I o II debido a que las proteínas de estos grupos no son dependientes de NAD⁺ y por lo tanto su actividad no se ve influenciada de manera negativa por el efecto del AP sobre el estado metabólico celular.

En adición, la disminución en los niveles de acetilación que se propone es generada por la sobreactivación de una HDAC dependiente de Zn⁺ podría estar vinculada a la reducción de la actividad de SIRT1; puesto que este cambio siempre se manifiesta de manera posterior a la elevación de H3K9ac, algo que como ya se había mencionado corresponde al punto en el que la SIRT1 probablemente ya no está ejerciendo su función sobre esta modificación.

La propuesta anterior está respaldada por investigaciones recientes que indican que NF-κB, un factor transcripcional que es inhibido por SIRT1, promueve la expresión de HDAC2⁷¹, una desacetilasa de histonas presente de manera ubicua en el núcleo de todas las células que también actúa sobre la H3K9ac⁷².

Cabe mencionar que, de manera interesante, la disminución a las 24 horas que el AP induce en los niveles de H3K9ac replica el efecto que se reporta tienen las HFD en la acetilación de la cromatina de células nerviosas; se ha observado que en los hipocampos de ratones alimentados con una dieta HFD por 8 semanas existe una reducción global en los niveles de acetilación⁷⁰.

Por último, es importante mencionar que muchos de los cambios observados en este modelo de estudio coinciden con fenómenos que se dan durante el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, SIRT1 es una de las proteínas cuyos niveles disminuyen conforme los organismos envejecen^{34,73}.

Por otro lado, la disminución de la acetilación observada en los tratamientos de AP también es algo que se da en organismos senescentes^{74,75}. Estas semejanzas entre el fenotipo producido por el envejecimiento y el fenotipo generado por alteraciones metabólicas resaltan la similitud que existe entre los dos fenómenos y sustenta la idea de que el envejecimiento en gran parte es regulado por factores externos, dentro de los cuales la dieta ocupa un lugar predilecto debido a la relación que guarda el metabolismo con la función celular en todos sus niveles.

CONCLUSIÓN

Estos datos sugieren que las células de neuroblastoma son un modelo experimental que responde al AP de una manera parecida a la de las células nerviosas, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, lo que probablemente significa que el AP está teniendo un efecto metabólico parecido en neuronas y células de neuroblastoma.

La exposición a AP y su posterior incorporación al interior celular, a manera de reservas energéticas contenidas en cuerpos lipídicos, produce cambios metabólicos en las células de neuroblastoma que se ven reflejados en una reducción de la actividad y niveles proteícos de SIRT1. Esto a su vez promueve variaciones en los niveles de H3K9ac a lo largo del tiempo. De manera concreta, primero hay un aumento en H3K9ac que se asocia con la ausencia de la actividad desacetilasa de SIRT1, para después haber una disminución que probablemente se deba a la acción de otra HDAC que no es dependiente de NAD⁺.

PERSPECTIVAS

Este trabajo nos ayuda a comprender la manera en que las alteraciones metabólicas inducidas por el AP inciden sobre la estructura de la cromatina al disminuir la acetilación y promover un ambiente condensado poco favorable para la expresión. Sin embargo, a partir de estos resultados surgen nuevas interrogantes que sería interesante responder.

En primer lugar, describir el mecanismo responsable de la disminución en la acetilación es de gran importancia ya que mejoraría nuestro entendimiento de cómo alteraciones metabólicas pueden derivar en el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento como las neurodegenerativas. Por otro lado, abre la posibilidad de desarrollar tratamientos farmacéuticos encaminados a bloquear algún elemento de dicho mecanismo previniendo los cambios generados por éste. Para resolver dicha pregunta sería conveniente determinar si en efecto HDAC2 está involucrada en la disminución de la acetilación y si esto tiene alguna relación con que el AP esté generando un aumento en la actividad de NF- κ B

En segundo lugar, si bien ya se observó que existe una asociación entre el AP y cambios en modificaciones post-traduccionales asociadas al grado de compactación de la cromatina, es importante determinar cómo esto incide en la expresión de genes de interés. Por ejemplo, en otros modelos experimentales se ha comprobado que esta baja en la acetilación coincide con una disminución en la expresión de BDNF, un factor neurotrófico importante en la plasticidad neuronal y los procesos cognitivos. Definir si en el caso del AP ocurre lo mismo y si esto se debe a cambios en el promotor del gen ya mencionado, nos ayudaría a comprender la manera en que estos cambios metabólicos están impactando sobre procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje.

BIBLIOGRAFÍA

1. Waddington, C. H. The epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 10–13 (2012).
2. Benayoun, B. A., Pollina, E. A. & Brunet, A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 593–610 (2015).
3. Hansen, J. C. Conformational Dynamics of the Chromatin Fiber in Solution: Determinants, Mechanisms, and Functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361–392 (2002).
4. Bártová, E., Krejčí, J., Harničarová, A., Galiová, G. & Kozubek, S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J. Histochem. Cytochem.* **56**, 711–721 (2008).
5. Muñoz-Najar, U. & Sedivy, J. M. Epigenetic Control of Aging. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 241–259 (2011).
6. Tse, C., Sera, T., Wolffe, P. & Hansen, J. C. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4629–4638 (1998).
7. Losson, H., Schneckeburger, M., Dicato, M. & Diederich, M. Natural compound histone deacetylase inhibitors (HDACi): Synergy with inflammatory signaling pathway modulators and clinical applications in cancer. *Molecules* **21**, (2016).
8. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone Acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
9. Marks, P. A. *et al.* HISTONE DEACETYLASES AND CANCER: CAUSES AND THERAPIES. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 194–202 (2001).
10. Yang, X.-J. & Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**, 5310–5318 (2007).
11. Martinez-Redondo, P. & Vaquero, A. The Diversity of Histone Versus Nonhistone Sirtuin Substrates. *Genes Cancer* **4**, 148–163 (2013).
12. Wang, Y. *et al.* Dysregulation of histone acetyltransferases and deacetylases in cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, (2014).
13. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).

14. Henry, R. A., Kuo, Y. M. & Andrews, A. J. Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry* **52**, 5746–5759 (2013).
15. Sanders, B. D., Jackson, B. & Marmorstein, R. Structural Basis for Sirtuin Function: What We Know and What We Don't. **1804**, 1604–1616 (2011).
16. RUIJTER, A. J. M. de, GENNIP, A. H. van, CARON, H. N., KEMP, S. & KUILENBURG, A. B. P. van. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749 (2003).
17. Dali-Youcef, N. *et al.* Sirtuins: The 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. doi:10.1080/07853890701408194
18. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* **16**, 93–105 (2004).
19. Vaquero, A. *et al.* SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* **450**, 440–444 (2007).
20. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 225–238 (2012).
21. Cantó, C. Dietary restriction and Sirtuin 1 in metabolic health: connections and divergences. *Proc. Nutr. Soc.* **75**, 30–37 (2016).
22. Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr. Rev.* **31**, 194–223 (2010).
23. Smith, B. C., Hallows, W. C. & Denu, J. M. A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal. Biochem.* **394**, 101–109 (2009).
24. Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434**, 113–118 (2005).
25. Daitoku, H., Sakamaki, J. ichi & Fukamizu, A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1954–1960 (2011).
26. Cantó, C. & Auwerx, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 98–105 (2009).
27. Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending Healthy Life Span--From Yeast to

- Humans. *Science (80-.)*. **328**, 321–326 (2010).
28. Renehan, A. G. & Howell, A. Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes. *Lancet* **365**, 1449–1451 (2005).
 29. Radak, Z. *et al.* Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radical Biology and Medicine* **58**, 87–97 (2013).
 30. Anderson, R. M., Shanmuganayagam, D. & Weindruch, R. Caloric Restriction and Aging: Studies in Mice and Monkeys. *Toxicol. Pathol.* **37**, 47–51 (2009).
 31. Ricki J. Colman, Rozalyn M. Anderson, Sterling C. Johnson, Erik K. Kastman, Kristopher J. Kosmatka T. Mark Beasley, David B. Allison, Christina Cruzen, Heather A. Simmons, Joseph W. Kemnitz, R. W. Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science (80-.)*. **325**, 201–204 (2009).
 32. Chen, D. *et al.* Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction service Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* **22**, 1753–57 (2008).
 33. Civitarese, A. E. *et al.* Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans. *PLoS One* **4**, (2007).
 34. Quintas, A., De Solís, A. J., Díez-Guerra, F. J., Carrascosa, J. M. & Bogónez, E. Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus. Prevention by late onset caloric restriction. *Exp. Gerontol.* **47**, 198–201 (2012).
 35. Caro, P. *et al.* Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* **10**, 579–592 (2009).
 36. Fusco, S. *et al.* A role for neuronal cAMP responsive-element binding (CREB)-1 in brain responses to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 621–6 (2012).
 37. Csiszar, A. *et al.* Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: Role of circulating factors and SIRT1. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 518–527 (2009).
 38. Greenwood, C. E. & Winocur, G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol. Aging* **26**, 42–45 (2005).
 39. Kim, H. J. *et al.* Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J. Proteome Res.* **10**, 722–731 (2011).
 40. Kreutzenberg, S. V. De *et al.* Downregulation of the Longevity-Associated Protein Sirtuin

- 1 in Insulin Resistance and Metabolic Syndrome: Potential Biochemical Mechanisms. *Diabetes* **59**, 1006–1015 (2010).
41. Chalkiadaki, A. & Guarente, L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab.* **16**, 180–188 (2012).
 42. Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. & Tschop, M. H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9793–9798 (2008).
 43. Yoshizaki, T. *et al.* SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E419–E428 (2010).
 44. Beaudoin, M.-S. *et al.* Resveratrol supplementation improves white adipose tissue function in a depot-specific manner in Zucker diabetic fatty rats. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R542–R551 (2013).
 45. Hong, J. *et al.* Mitochondrial complex I deficiency enhances skeletal myogenesis but impairs insulin signaling through SIRT1 inactivation. *J. Biol. Chem.* **289**, 20012–20025 (2014).
 46. Li, X. SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **45**, 51–60 (2013).
 47. Cao, Y. *et al.* SIRT1 and insulin resistance. *J. Diabetes Complications* **30**, 178–183 (2016).
 48. Guo, W. *et al.* Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *J. Neurosci. Res.* **89**, 1723–1736 (2011).
 49. Codocedo, J. F., Allard, C., Godoy, J. A., Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N. C. SIRT1 Regulates Dendritic Development in Hippocampal Neurons. *PLoS One* **7**, (2012).
 50. Godoy, J. A., Zolezzi, J. M., Braidy, N. & Inestrosa, N. C. Role of Sirt1 During the Ageing Process: Relevance to Protection of Synapses in the Brain. *Molecular Neurobiology* **50**, 744–756 (2014).
 51. Min, S. W. *et al.* Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* **67**, 953–966 (2010).
 52. Magistretti, P. J. & Allaman, I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and

- Functional Imaging. *Neuron* **86**, 883–901 (2015).
53. Kaplan, R. J. & Greenwood, C. E. Dietary saturated fatty acids and brain function. *Neurochem. Res.* **23**, 615–626 (1998).
 54. Corpas, R. *et al.* SIRT1 Overexpression in Mouse Hippocampus Induces Cognitive Enhancement Through Proteostatic and Neurotrophic Mechanisms. *Molecular Neurobiology* 1–16 (2016). doi:10.1007/s12035-016-0087-9
 55. Luchsinger, J. A., Tang, M.-X., Shea, S. & Mayeas, R. Caloric Intake and the Risk of Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* **59**, (2002).
 56. Kalmijn, S., Feskens, E. J., Launer, L. J. & Kromhout, D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* **145**, 33–41 (1997).
 57. Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S. & Arias, C. Short-Term High-Fat-and-Fructose Feeding Produces Insulin Signaling Alterations Accompanied by Neurite and Synaptic Reduction and Astroglial Activation in the Rat Hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 1001–1008 (2014).
 58. Mancini, A. *et al.* Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on health. *Molecules* **20**, 17339–17361 (2015).
 59. Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K. & Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell. Signal.* **25**, 1939–1948 (2013).
 60. Flores, M. Papel del metabolismo energético y la inhibición de sirtuina 1 en la expresión de marcadores de la enfermedad de alzheimer. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2016).
 61. Alberghina, M., Lupo, G., Anfuso, C. D. & Moro, F. Palmitate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of rat visual system during aging. *Neuroscience Letters* **150**, 17–20 (1993).
 62. Tone, O., Miller, J. C., Bell, J. M. & Rapoport, S. I. Regional cerebral palmitate incorporation following transient bilateral carotid occlusion in awake gerbils. *Stroke* **18**, 1120–1127 (1987).
 63. Allweis, C., Landau, T., Aeeles, M. & Magnes, J. The Oxidation of Uniformly Labelled Albumin-Bound Palmitic Acid To Co₂ By the Perfused Cat Brain. *J. Neurochem.* **13**,

- 795–804 (1966).
64. Warshaw, J. B. & Terry, M. L. Cellular energy metabolism during fetal development. *Dev. Biol.* **52**, 161–166 (1976).
 65. Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V. & Lyakhovich, V. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int* **2014**, 472459 (2014).
 66. Ebert, D., Haller, R. G. & Walton, M. E. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci.* **23**, 5928–35 (2003).
 67. Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714 (2012).
 68. Farese, R. V. & Walther, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* **139**, 855–860 (2009).
 69. Yamakuchi, M. & Lowenstein, C. J. MiR-34, SIRT1 and p53: The feedback loop. *Cell Cycle* **8**, 712–715 (2009).
 70. Sharma, S. & Taliyan, R. Epigenetic modifications by inhibiting histone deacetylases reverse memory impairment in insulin resistance induced cognitive deficit in mice. *Neuropharmacology* **105**, 285–297 (2016).
 71. Ibi, D. *et al.* Antipsychotic-induced Hdac2 transcription via NF-κB leads to synaptic and cognitive side effects. *Nat. Neurosci.* (2017). doi:10.1038/nn.4616
 72. Hagelkruys, A. *et al.* Essential Nonredundant Function of the Catalytic Activity of Histone Deacetylase 2 in Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 462–474 (2016).
 73. Li, N., Muthusamy, S., Liang, R., Sarojini, H. & Wang, E. Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 75–85 (2011).
 74. Peleg, S., Feller, C., Ladurner, A. G. & Imhof, A. The Metabolic Impact on Histone Acetylation and Transcription in Ageing. *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 700–711 (2016).
 75. Peleg, S. *et al.* Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice. *Science (80-.)*. **328**, 753–756 (2010).
 76. Globa, A. K. & Bamji, S. X. Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Current Opinion in Neurobiology* **45**, 210–220 (2017).

77. Fukata, Y. & Fukata, M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 161–175 (2010).
78. Young, F. B., Butland, S. L., Sanders, S. S., Sutton, L. M. & Hayden, M. R. Putting proteins in their place: Palmitoylation in Huntington disease and other neuropsychiatric diseases. *Progress in Neurobiology* **97**, 220–238 (2012).
79. Lardenoije, R. *et al.* The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* **131**, 21–64 (2015).
80. Bonda, D. J. *et al.* The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: Mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet Neurology* **10**, 275–279 (2011).
81. Davletov, B. & Montecucco, C. Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology* **20**, 543–549 (2010).
82. Weindruch, R., Walford, R. L., Fligiel, S. & Guthrie, D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr.* **116**, 641–654 (1986).
83. Pardridge, W. M. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev* **63**, 1481–1535 (1983).
84. Wang, G. G., Allis, C. D. & Chi, P. Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 373–380 (2007).
85. Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. & David Allis, C. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 983–994 (2007).
86. Funato, H., Oda, S., Yokofujita, J., Igarashi, H. & Kuroda, M. Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS One* **6**, (2011).
87. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by Mammalian Sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 (2013).
88. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* **282**, 1745–1767 (2015).
89. Patel, N. V *et al.* Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol. Aging* **26**, 995–1000 (2005).
90. Carrer, A. *et al.* Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation

- Levels. *J. Biol. Chem.* **292**, 3312–3322 (2017).
91. Cuvier, O. & Fierz, B. Dynamic chromatin technologies: from individual molecules to epigenomic regulation in cells. *Nat. Publ. Gr.* (2017). doi:10.1038/nrg.2017.28
 92. Sun, D. *et al.* Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell* **14**, 673–688 (2014).
 93. Sahin, K., Yilmaz, S. & Gozukirmizi, N. Changes in human sirtuin 6 gene promoter methylation during aging. *Biomed. Reports* 574–578 (2014). doi:10.3892/br.2014.266
 94. Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H. & Janetzky, B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm* 17–28 (2007). doi:10.1007/978-3-211-73574-9-3
 95. Science, S., Series, N. & Jun, N. DNA Methylation Decreases in Aging but not in Immortal Cells Author (s): Vincent L . Wilson and Peter A . Jones. **220**, 1055–1057 (2014).
 96. Jiang, W. *et al.* SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells. *Sci. Rep.* **4**, 7456 (2014).
 97. Rizza, W., Veronese, N. & Fontana, L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? *Ageing Res. Rev.* **13**, 38–45 (2014).
 98. Oberdoerffer, P. *et al.* SIRT1 Redistribution on Chromatin Promotes Genomic Stability but Alters Gene Expression during Aging. *Cell* **135**, 907–918 (2008).
 99. dos Santos Sant' Anna, G. *et al.* Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats. *Neurosci. Lett.* **556**, 152–154 (2013).
 100. Wen, Y. C. *et al.* Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**, 437–448 (2005).
 101. Bonkowski, M. S. & Sinclair, D. A. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 679–690 (2016).
 102. Bosch-Presegué, L. *et al.* Stabilization of Suv39H1 by SirT1 Is Part of Oxidative Stress Response and Ensures Genome Protection. *Mol. Cell* **42**, 210–223 (2011).
 103. Martin, B., Golden, E., Egan, J. M., Mattson, M. P. & Maudsley, S. Reduced energy intake: the secret to a long and healthy life? *IBS J Sci.* **27**, 590–609 (2007).
 104. Patil, S. & Chan, C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neuroscience Letters* **384**,

288–293 (2005).

105. Leung, A., Trac, C., Du, J., Natarajan, R. & Schones, D. E. Persistent chromatin modifications induced by high fat diet. *J. Biol. Chem.* **291**, 10446–10455 (2016).
106. Thiele, C. J. *Neuroblastoma Cell Lines. Human Cell* **1**, (1998).
107. Matsuzawa-Nagata, N. *et al.* Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* **57**, 1071–1077 (2008).
108. Wang, R. H. *et al.* Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. *Cancer Cell* **14**, 312–323 (2008).
109. Moskalev, A. A., Aliper, A. M., Smit-McBride, Z., Buzdin, A. & Zhavoronkov, A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle* **13**, 1063–1077 (2014).
110. Moskalev, A. A. Evolutionary ideas on the nature of aging. *Adv. Gerontol.* **1**, 112–121 (2011).
111. Kumar, S., Pamulapati, H. & Tikoo, K. Fatty acid induced metabolic memory involves alterations in renal histone H3K36me2 and H3K27me3. *Mol. Cell. Endocrinol.* **422**, 233–242 (2016).
112. Burgess, R. C., Misteli, T. & Oberdoerffer, P. DNA damage, chromatin, and transcription: The trinity of aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 724–730 (2012).
113. Hall, E. *et al.* Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med* **12**, 103 (2014).
114. Carpentieri, A. *et al.* Differentiation of human neuroblastoma cells toward the osteogenic lineage by mTOR inhibitor. *Cell Death Dis.* **6**, e1974 (2015).
115. Schumacher, B., Garinis, G. A. & Hoeijmakers, J. H. J. Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet.* **24**, 77–85 (2008).
116. Malmgren, S. *et al.* Coordinate changes in histone modifications, mRNA levels, and metabolite profiles in clonal INS-1 832/13 β -cells accompany functional adaptations to lipotoxicity. *J. Biol. Chem.* **288**, 11973–11987 (2013).
117. Choi, S. & Friso, S. Epigenetics : A New Bridge between Nutrition different folate studies pre and post. 8–16 (2010). doi:10.3945/an.110.1004.8
118. Niu, L. *et al.* High Sugar diet shows symptoms of alzheimers in rats. **20**, 509–513 (2016).
119. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).

120. Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R. & Verreault, A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* **436**, 294–8 (2005).
121. Striedter, G. F. A history of ideas in evolutionary neuroscience. *Evol. Nerv. Syst.* **1**, 1–15 (2010).
122. Mathers, J. C. Impact of nutrition on the ageing process. *Br. J. Nutr.* **113**, S18–S22 (2015).
123. Paull, T. T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**, 886–895 (2000).
124. Oliveira Giguek, C. SIRT1, IGFBP-3 and CAV1 Promoter DNA Methylation in Aging. *Transl. Med.* **4**, 5–8 (2014).
125. Patil, S., Sheng, L., Masserang, A. & Chan, C. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **406**, 55–59 (2006).
126. Alberghina, M., Lupo, G., Anfuso, C. D. & Moro, F. Palmitate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of rat visual system during aging. *Neurosci. Lett.* **150**, 17–20 (1993).
127. Weinberger, L. *et al.* Expression Noise and Acetylation Profiles Distinguish HDAC Functions. *Mol. Cell* **47**, 193–202 (2012).
128. Patil, S. & Chan, C. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **384**, 288–293 (2005).
129. Li, Y. & Tollefsbol, T. O. P16INK4A suppression by glucose restriction contributes to human cellular lifespan extension through SIRT1-mediated epigenetic and genetic mechanisms. *PLoS One* **6**, (2011).
130. Chang, H. C. & Guarente, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 138–145 (2014).
131. Jenwitheesuk, A., Nopparat, C., Mukda, S., Wongchitrat, P. & Govitrapong, P. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16848–16884 (2014).
132. Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic

Disorders of Human Obesity in Rodents*. *Obesity* **15**, 798–808 (2007).

133. Snigdha, S. *et al.* H3K9me3 Inhibition Improves Memory, Promotes Spine Formation, and Increases BDNF Levels in the Aged Hippocampus. *J. Neurosci.* **36**, 3611–3622 (2016).
134. Lupiáñez, D. G. *et al.* Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions. *Cell* **161**, 1012–1025 (2015).

ANEXO I

Anticuerpos primarios	Especie	Marca	IF	WB
H3 (N-terminal)	Anti-conejo	Sigma (H9289)	X	1:1000
H3K9ac	Anti-conejo	Abcam (ab10812)	1:1000	1:1000
SIRT1	Anti-ratón	Abcam (ab104833)	X	1:1000
β -actina	Anti-ratón	Sigma-Aldrich (A2228)	X	1:1000

ANEXO II

Anticuerpos secundarios	Especie	Marca	IF	WB
Goat anti-rabbit HRP IgG	Anti-cabra	Santa Cruz (SC-2030)	X	1:15,000
Goat anti-mouse HRP IgG	Anti-cabra	Invitrogen (62-6520)	X	1:15,000
Alexa 488	Anti-cabra	Invitrogen (11034)	1:1000	X