



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Alteración metabólica inducida por el ácido
palmítico y su papel en los cambios bioquímicos que
llevan a la hiperfosforilación de la proteína tau

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

VALERIA MELISSA GARCÍA CRUZ

ASESOR: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2019.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
CUAUTITLÁN

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Alteración metabólica inducida por el ácido palmítico y su papel en los cambios bioquímicos que llevan a la hiperfosforilación de la proteína tau

Que presenta la pasante: **Valeria Melissa García Cruz**

Con número de cuenta: **414004717** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	
VOCAL	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	L.B.D. Rosa María de los Ángeles López Cabrera	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriel Arturo Lima Villeda	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

RECONOCIMIENTO

Éste proyecto fue realizado en el laboratorio a cargo de la Dra. Clorinda Arias Álvarez, en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi casa de estudios.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez, por permitirme el ingreso a su laboratorio y con ello darme la oportunidad de desarrollarme académica y personalmente contribuyendo así a mi formación.

A Kari Sánchez Alegría, por enseñarme las técnicas necesarias para la elaboración de éste trabajo, por su paciencia, por las tardes de risa en el laboratorio y por brindarme no sólo su conocimiento si no también su amistad.

A Martha Pérez Dominguez, Marthis, por ayudarme con mis inmunofluorescencias y con tus observaciones para presentar un mejor trabajo.

A Patricia Ferrera por el apoyo técnico con la línea celular utilizada.

A mis compañeros y amigos de la facultad: Esmeralda, Giovani, Fernando, Alfredo y Arely por hacer los tiempos de estudio, trabajo y desvelos, muy amenos y además por la amistad que hasta ahora se mantiene.

A mis amigos en general, porque siempre me han brindado grandiosos momentos y porque en tiempos de estrés nunca fallaron en sacarme una sonrisa.

A mis demás compañeros del laboratorio Liz, Eva, César, Pau, Isela, Eduardo, Kari H, Nelly, Manuel y Denisse por ser un equipo tan cálido y por hacer de mis días en el laboratorio muy agradables, divertidos, y porque siempre que necesité apoyo tanto académico como personal, me lo brindaron sin dudarlo.

A los miembros de mi jurado, por su tiempo para hacer del presente un mejor trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá, Josefina, con todo mi cariño, porque sin tu apoyo, tus enseñanzas, tus cuidados, tu amor incondicional, nada de esto habría sido posible y porque siempre me animas y sigues guándome para seguir adelante.

A mis tías Cris, Gloria, tíos, Polo, Ricardo, Miguel, a Emilita, todos han contribuido de diferente manera a la formación de la persona que soy hoy en día.

A mi abuelito, Juan Ricardo García Matías, que sé que me sigue apoyando y queriendo desde donde se encuentre.

INDICE

1. RESUMEN	16
2. INTRODUCCIÓN	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 LAS DIETAS ALTAS EN GRASAS (HFD) Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.	18
3.2 EL ÁCIDO PALMÍTICO, COMO PRINCIPAL COMPONENTE DE LAS HFD Y SU METABOLISMO EN EL SNC	18
a. LA PROTEÍNA TAU: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	20
3.3.1 ESTRUCTURA	20
3.3.2 FUNCIÓN	22
3.3.3 LOCALIZACIÓN	24
3.4 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE TAU: FOSFORILACIÓN Y ACETILACIÓN	25
3.4.1 FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU	25
3.4.2 ACETILACIÓN DE LA PROTEINA TAU	28
3.4.3 IMPLICACIONES DE LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU: FORMACIÓN DE MARAÑAS NEUROFIBRILARES	30
3.5 REGULACIÓN DE LA LA VÍA DE LA INSULINA/PI3K/AKT Y SU PAPEL EN LA FOSFORILACIÓN DE TAU	31
3.6 IMPLICACIONES DE LA VÍA mTOR EN LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU.	33
3.7 GSK3 β , REGULACIÓN Y PAPEL COMO PRINCIPAL MEDIADOR EN LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU.	34
3.7.1 GSK3 β Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	36
3.8 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y FISIOPATOLÓGICAS:	37
4. ANTECEDENTES	39
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
6. JUSTIFICACIÓN	41
7. OBJETIVOS	42

7.1 OBJETIVO GENERAL	42
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
8. HIPÓTESIS	43
9. MATERIALES Y MÉTODOS	44
9.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL	44
9.2 LÍNEA TEMPORAL DE EXPERIMENTACIÓN	45
9.3 CULTIVO CELULAR	46
9.4 DIFERENCIACIÓN CELULAR, NEUROBLASTOMA A NEURONA.	46
9.5 PREPARACIÓN DEL ÁCIDO PALMÍTICO	46
9.6 TRATAMIENTOS CON ÁCIDO PALMÍTICO PARA LA CURVA DOSIS-RESPUESTA.	47
9.7 TRATAMIENTOS CON ÁCIDO PALMÍTICO PARA LA CURVA TIEMPO-EFECTO.	48
9.8 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	48
9.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	49
9.10 WESTERN BLOT	49
9.11 INMUNOFUORESCENCIA	51
9.12 ANÁLISIS DE DATOS DE WESTERN BLOT	52
10. RESULTADOS	53
10.1 VALIDACIÓN DEL MODELO UTILIZADO	53
10.2 LA EXPOSICIÓN A LARGO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO INCREMENTA LA HIPERFOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.	54
10.3 LA EXPOSICIÓN PROLONGADA AL AP PARECE NO AFECTAR LOS NIVELES PROTEICOS DE TAU.	55
10.4 LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU ANTE LA EXPOSICIÓN DE AP A LARGO PLAZO PARECE ESTAR MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA CINASA GSK3 β .	56
10.5 EL AP NO MODIFICA EL CONTENIDO TOTAL DE GSK3 β A LARGO PLAZO	57
10.6 LA EXPOSICIÓN A CORTO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO INCREMENTA LA HIPERFOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.	58
10.7 LA EXPOSICIÓN A CORTO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO NO MODIFICA EL CONTENIDO DE TAU	59

<i>10.8 LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU ANTE LA EXPOSICIÓN DE AP A CORTO PLAZO NO SE ASOCIA CON LA ACTIVACIÓN DE GSK3β.</i>	60
<i>10.9 EL AP NO AFECTA LOS NIVELES PROTEICOS DE GSK3β.</i>	61
<i>10.10 EL AP INCREMENTA LA ACETILACIÓN DE TAU ANTE UNA EXPOSICIÓN A CORTO Y LARGO PLAZO.</i>	62
11. DISCUSIÓN	64
12. CONCLUSIÓN	69
13. REFERENCIAS	70
14. ANEXOS	76
<i>14.1 SOLUCIONES UTILIZADAS</i>	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura e isoformas de la proteína tau.	21
Figura 2. Localización y función de tau.	24
Figura 3. Sitios de fosforilación de tau	26
Figura 4. Sitios de fosforilación de la proteína tau.	27
Figura 5. Reacción de fosforilación de tau.	27
Figura 6. Reacción de acetilación.	30
Figura 7. Vía de la Insulina/PI3K/Akt: regulación sobre tau.	33
Figura 8. Regulación de GSK3 β y su acción sobre tau	36
Figura 9. Línea temporal de experimentación.	45
Figura 9. Cultivo de células de Neuroblastoma humano de la línea MSN.	53
Figura 10. El AP incrementa p-tau a 24h.	54
Figura 11. El AP no modifica el contenido total de tau a 24h.	55
Figura 12. El AP activa a GSK3 β a 24h.	56
Figura 13. El AP no modifica a GSK3 β a 24h.	57
Figura 14. Incremento de p-tau ante AP a 1h.	58
Figura 15. Tau no se modifica bajo 1h de AP.	59
Figura 16. EL AP a 1h no activa a GSK3 β .	60
Figura 17. El AP no modifica a GSK3 β	61
Figura 18. El AP incrementa la acetilación de tau a 24h	62

Figura 19. El AP incrementa la acetilación de tau a 1h.

63

Figura 20. Mecanismo de acción propuesto sobre los efectos del AP en la fosforilación y acetilación de tau y su relación con GSK3 β .

68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de los tratamientos aplicados al modelo de estudio.	47
Tabla 2. Especificaciones de los tratamientos aplicados al modelo de estudio.	48
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la técnica de western blot.	50
Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica.	52

GLOSARIO

μM	Micromolar
Akt/PKB	<i>Protein Kinase B</i> (Proteína Cinasa B)
AP	<i>Palmitic Acid</i> (Ácido Palmítico)
APP	<i>Amiloid Precursor Protein</i> (Proteína Precursora Amiloidea)
AR	<i>Retinoic Acid</i> (Ácido Retinoico)
APS	<i>Amonium persulphate</i> (Persulfato de Amonio)
ATP	<i>Adenosin Tri-Phosphate</i> (Trifosfato de Adenosina)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de Suero Bovino)
cAMP	Adenosine Mononucleotide Phosphate ciclic. (Mononucleótido fosfato de Adenosina ciclico).
CBP	<i>CREB-Bingin Protein</i> (Proteina de Unión a CREB)
DAPI	4,6-dianidino-2-fenilindol
DMII	Diabetes Mellitus Tipo II
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico.</i>
EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
EOAD	<i>Early Onset Alzheimer Disease</i> (Enfermedad de Alzheimer de Aparición Temprana)
GSK3b	<i>Glycogen Sinthase Kinase 3</i> (Cinasa Sintasa de Glicógeno 3)
GTP	<i>GuanosineTriphosphate</i> (Trifostato de Guanosina) (Trifosfato de Guanosina)
HAT	<i>Hystone Deacethylase</i> (Desacetilasas de Histonas)

HFD	<i>High Fat Diets</i> (Dietas altas en grasas)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidasa de Rábano)
IR	Insulin Receptor (Receptor de la Insulina)
IRS-1	Sustrato Receptor de la Insulina
JNK	Cinasas c-Jun-N-terminal
KDa	Kilodalton
LOAD	Late-Onset Alzheimer Disease (Enfermedad de Alzheimer de Aparición Tardía)
M	Molar
MAPKs	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteínas Cinasas Activadores de Mitógenos)
MAPs	Microtubule Associated Proteins (Proteínas Asociadas a Microtúbulos)
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau (Proteína asociada a Microtúbulos Tau)
MARK2	Microtubule Affinity Regulating Kinase 2 (Cinasa reguladora de afinidad a microtúbulos 2)
mM	Milimolar
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
mTOR	Mamalian Target Of Rapamicyn
mTORC1	<i>Mamalian Target Of Rapamicyn Complex 1</i>
mTORC2	<i>Mamalian Target Of Rapamicyn Complex 2</i>
n	<i>Experimento Independiente</i>

nm	Nanometros
NAD	Nicotinamida Adenina Dinocluótido oxidado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinocluótido reducido
NFT	<i>Neurofibrillary Tangles</i> (Marañas Neurofibrilares)
NGF	<i>Neural Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Nervioso)
NRTK's	<i>No Receptores Tirosin Cinasas</i>
p300	<i>Proteína de 300 KDa</i>
PB	<i>Phosphate Buffer</i> (Amortiguador de Fosfatos)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Amortiguador de Sales y Fosfatos)
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase1</i> (Cinasa dependiente de fosfoinositol 1)
PFA	Paraformaldehido
PI3K	<i>Phosphatidil Inositol 3 Kinase</i> (Fosfatidil Inositol trifosfato)
PIP2	<i>Phosphatidil Inositol Bisphosphate</i> (Fosfatidil Inositol Bifosfato)
PIP3	<i>Phosphatidil Inositol Triphosphate</i> (Fosfatidil Inositol Trifosfato)
PKA	<i>Protein Kinase A</i> (Proteína Cinasa A)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Cinasa C)
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i> (Proteína Fosfatasa 1)
PP2A	<i>Protein Phosphatase A</i> (Proteína Fosfatasa A)
PP2B	<i>Protein Phosphatase 2B</i> (Proteína Fosfatasa 2B)
PP5	<i>Protein Phosphatase 5</i> (Proteína Fosfatasa 5)

RI	Resistencia a la Insulina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Del inglés <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (medio de cultivo celular)
RPMI-SFB	Medio de cultivo celular sin suero fetal bovino.
RTKs	Receptores Tirozyn-Cinasas
S6K	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase</i> (Cinasa Proteína Ribosomal S6)
SEM	Error estandar de la media
SIRT1	Sirtuína 1
SM	Síndrome Metabólico
SUMO	Small Ubiquitin-related modifier
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Solución salina tamponada con Tris).
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween</i> (Solución salina y de tween tamponada con Tris)
ac-tau	Tau Acetilada
p-tau	Tau fosforilada
t-tau	Tau total
UPS	Ubiquitin Proteasome System (Sistema Ubiquitin/Proteosoma)
V	Volts

1. RESUMEN

El consumo de dietas altas en grasas, particularmente por su contenido en el ácido graso saturado, ácido palmítico (AP), ha sido asociado con cambios bioquímicos implicados en la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha sugerido que el consumo de estas dietas contribuye a la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que llevaría a la formación de marañas neurofibrilares (NFTs-del inglés Neurofibrillary Tangles) -uno de los marcadores histopatológicos en la EA. Sin embargo, los mecanismos involucrados en los efectos negativos de estas dietas no han sido descritos del todo. La proteína Tau, es un regulador importante de la dinámica microtubular, y de este modo, de la estabilidad del citoesqueleto axonal, la transducción de señales y el transporte axonal. Por su parte, la cinasa GSK3 β ha sido identificada como una de los candidatos más importantes que median la hiperfosforilación de tau en residuos que se han encontrado en tejido cerebral de pacientes con EA. Se ha demostrado que la exposición neuronal al AP, incrementa la fosforilación de tau, pero no se sabe que cinasas se encuentran involucradas. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido analizar el papel de GSK3 β en la hiperfosforilación de tau inducida por AP, así como el papel del estado de acetilación de tau. Hemos usado cultivo celular de neuroblastoma humano, diferenciado a neuronas, que fueron expuestas a diferentes dosis de AP (100, 200 y 300 μ M) durante corto (1h) y largo (24h) plazo. Después, se analizó el contenido proteico de tau total, p-tau (ser199/202), GSK3 β total, p-GSK3 β (ser9) y ac-tau (K280) mediante Western Blot y se analizó la distribución de tau y p-tau mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Hemos hallado un incremento en la fosforilación de tau a una dosis de 200 μ M de AP a corto y largo plazo simultáneo con una reducción de GSK3 β en el residuo de inhibición, lo que significa que GSK3 β se está activando. Los resultados presentes demuestran que el AP es capaz de activar GSK3 β e inducir la fosforilación de tau en neuronas humanas.

2. INTRODUCCIÓN

La ingesta de dietas con alto contenido de ácidos grasos saturados, particularmente ácido palmítico (AP), se ha asociado con cambios bioquímicos que están implicados en la fisiopatología de enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes, síndrome metabólico, insulinoresistencia, etc, que a su vez, se han relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha sugerido que el consumo de estas dietas contribuye a la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que a su vez podría estar llevando a la formación de marañas neurofibrilares -uno de los marcadores histopatológicos de la EA-. Por otro lado, los mecanismos relacionados con los efectos de deterioro de estas dietas no ha sido descrito del todo. La proteína tau, es un regulador importante de la dinámica microtubular, y de este modo contribuye con la estabilidad del citoesqueleto, la transducción de señales y el transporte axonal. Por su parte, la cinasa GSK3 β ha sido identificada como uno de los candidatos más fuertes en la regulación de una de las modificaciones postraduccionales de la proteína tau, la hiperfosforilación, esto en residuos específicos que se han encontrado en cerebros de pacientes con la EA. De hecho, esta proteína se encuentra regulada por vías implicadas en el metabolismo energético como la vía de la insulina/PI3K/Akt y mTOR; cuya estabilidad se ha visto implicada bajo condiciones de dietas altas en grasas. Además, se ha demostrado que la exposición neuronal al AP incrementa la fosforilación de la proteína tau, sin embargo se desconoce las cinasas que están inmersas en dicho mecanismo. Otra de las modificaciones postraduccionales que sufre la proteína tau, es la acetilación, modificación que se ha visto, bloquea su ubiquitinización, y con ello, se evita su degradación mediante el sistema de degradación proteosomal (UPS). Por ello, el objetivo del trabajo, será analizar el papel de GSK3 β en la hiperforforilación de tau inducida por AP, así como el papel de la acetilación de tau en dicho mecanismo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LAS DIETAS ALTAS EN GRASAS (HFD) Y SU RELACIÓN CON ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

El consumo de dietas con alto contenido de grasas saturadas se asocia con el desarrollo de enfermedades metabólicas dentro de las que se encuentran, obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DMII), Síndrome Metabólico (SM) y Resistencia a la Insulina (RI).

Comúnmente, la población con enfermedades derivadas de una dieta alta en grasa, presentan una respuesta menor ante la hormona insulina, es decir, resistencia a la insulina, tal condición se ha relacionado directamente con el incremento en la posibilidad de disminuir la capacidad cognitiva, lo que gradualmente, conllevaría a una neurodegeneración (Calvo-Ochoa & Arias, 2015), de hecho, con estas condiciones, estudios epidemiológicos han sugerido que las dietas altas en grasas así como el grado de saturación de estas, incrementan significativamente el riesgo de desarrollar EA (Carta, Murru, Banni, & Manca, 2017).

Aunado a esto, hay evidencia sobre el efecto de las HFD en la hiperfosforilación de la proteína tau en sitios mediados por GSK3 β (Calvo-Ochoa, Hernández-Ortega, Ferrera, Morimoto, & Arias, 2014).

3.2 EL ÁCIDO PALMÍTICO, COMO PRINCIPAL COMPONENTE DE LAS HFD Y SU METABOLISMO EN EL SNC

El ácido palmítico, es un ácido carboxílico de 16 carbonos con cero insaturaciones; se trata del ácido graso saturado más común en las HFD. Representa del 20-30% del total de ácidos grasos presentes en la membrana fosfolípida. Bajo condiciones fisiológicas normales la acumulación de éste ácido graso se previene mediante su conversión a ácido palmitoléico u oléico. Sin embargo, un desbalance en el metabolismo y homeostasis de éste ácido graso puede derivar en condiciones

fisiopatológicas tales como alteraciones metabólicas, arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Carta et al., 2017).

Hasta ahora, hay debate acerca de la oxidación de ácidos grasos saturados en el tejido nervioso, específicamente, en las neuronas; ésto debido a su lento paso a través de la barrera hemoatoencefálica, sin embargo, estudios han demostrado la presencia de receptores directamente relacionados con el paso de ácidos grasos hacia la mitocondria en tejido nervioso. Dado estos hallazgos, se ha sugerido que luego de la disociación de ácidos grasos como el AP de proteínas acarreadoras como la albúmina, pueden ser transportados vía difusión pasiva a través de la membrana, para llevarse a cabo la β -oxidación, o en su caso, integrarse a la membrana fosfolipídica (Schönfeld & Reiser, 2013). De hecho, el paso del AP mediante difusión a través de la membrana, ha sido reportado previamente (Williams, Chang, Hayakawa, Grange, & Rapoport, 1997).

Por otro lado, hay evidencia de que el AP puede ser utilizado como recurso energético por las neuronas, evidenciado mediante la modificación en el contenido de NAD^+/NADH , lo que a su vez modifica el balance energético neuronal; dicha modulación, podría estar alterando diversas vías de señalización relacionadas ya que se han encontrado cambios en la activación metabólica inducida por insulina, que disminuyen la función de la vía insulina/PI3K/Akt mientras que, a su vez activa a mTOR río abajo de Akt. (Calvo-Ochoa, Sánchez-Alegría, Gómez-Inclán, Ferrera, & Arias, 2017).

Por otro lado, lesiones cerebrales se han asociado con niveles incrementados de ácido palmítico en la misma zona, por lo que se ha establecido como un factor independiente de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Además, se han encontrado altas concentraciones de ácido palmítico en las marañas neurofibrilares, características de la EA (Patil & Chan, 2005) y otras Tauopatías. Por otra parte, se ha visto que el AP puede inducir lipotoxicidad que resulta en una disfunción celular y subsecuentemente muerte celular. Sin embargo, los mecanismos o vías mediante las cuales el AP induce la muerte celular no están

completamente claras. Algunos reportes indican que las mitocondrias son de los primeros organelos blancos del efecto tóxico del AP (Rockenfeller & Gourlay, 2018)

a. LA PROTEÍNA TAU: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La proteína tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés microtubule-associated proteins) (Buée, Bussièrre, Buée-Scherrer, Delacourte, & Hof, 2000). Se trata de una de las MAPs más abundantes en el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados (Takuma, Arawaka, & Mori, 2003). En el ser humano se hallan específicamente en las neuronas (Buée et al., 2000).

3.3.1 ESTRUCTURA

Tau es codificada por un gen único de aproximadamente 100 Kb que se encuentra localizado en el cromosoma 17 en la posición 17q21, dicho gen contiene 16 exones, que mediante *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 genera 6 isoformas con contenido de aminoácidos que va de los 352 a los 441 y con pesos moleculares que varían desde los 45 hasta los 65 KDa (Buée et al., 2000).

Dichas isoformas varían en la presencia de 3 o 4 dominios de unión a microtúbulos en el extremo C-terminal (nombrados 3R ó 4R), ésto en combinación con la ausencia o presencia de uno o dos insertos de 29 aminoácidos en el extremo amino terminal; denominados bajo la siguiente nomenclatura 0N, 1N, 2N. La combinación de las características anteriores, generan las 6 isoformas conocidas de tau.

En el cerebro humano adulto, pueden encontrarse las 6 isoformas, con una mayor abundancia de aquellas que contienen 3 repeticiones en el C-terminal (3R) que las que contienen 4 repeticiones (4R). Dicha expresión de la proteína, se encuentra regulada en el desarrollo; en el cerebro fetal, por ejemplo, sólo es posible hallar la isoforma que contiene 0 insertos de aminoácidos, y 3 repeticiones del dominio de unión a microtúbulos (0N3R) (Takuma et al., 2003).

Tau es una proteína desplegada con una pequeña porción que se agrupa en estructura secundaria, todo ello es debido a que posee un carácter hidrofílico y a que tiene una mayor porción básica debido a su contenido en aminoácidos, por lo que no adopta una estructura compacta, de hecho se describe muchas veces como desordenada (Mukrasch et al., 2009).

Pueden distinguirse 4 dominios característicos a lo largo de la secuencia de la proteína: 1) El dominio de proyección N-terminal, 2) la región rica en prolinas, 3) la región de unión a microtúbulos y 4) la región C-terminal (Arendt, Stieler, & Holzer, 2016).

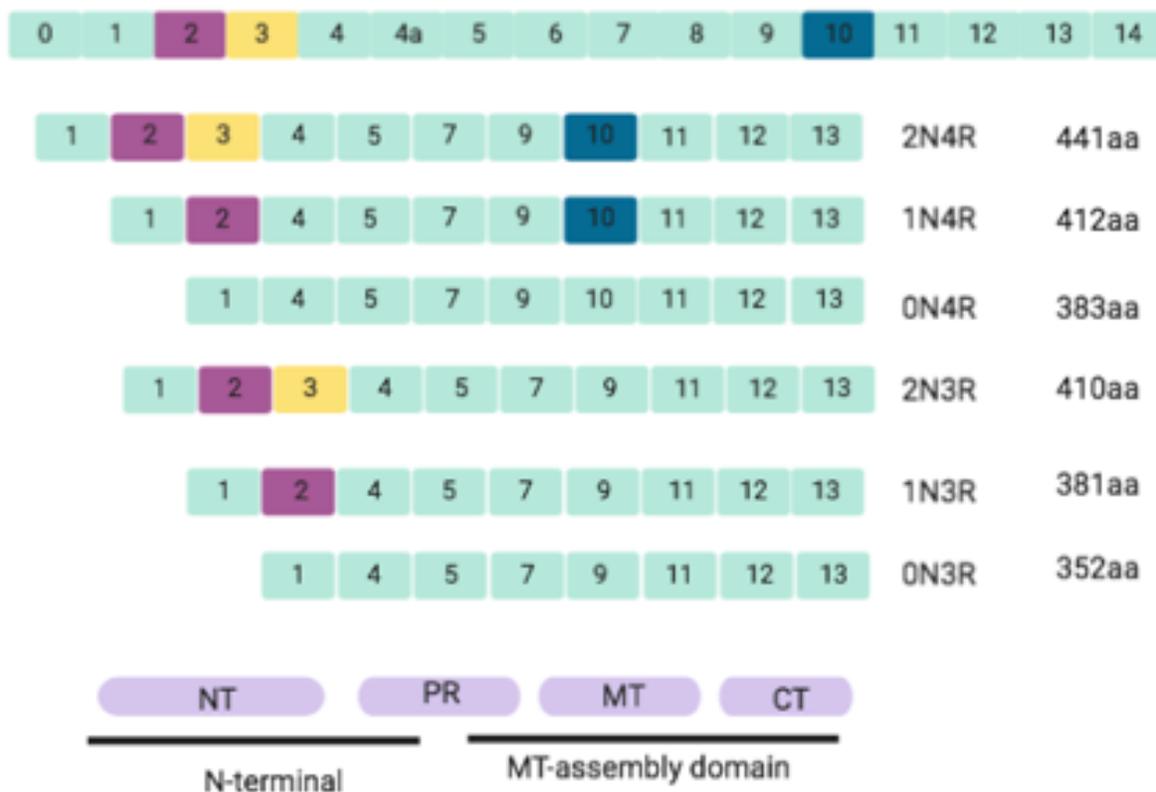


Figura 1. Estructura e isoformas de la proteína tau. Se presenta el RNAm con la presencia de los exones e intrones totales que conforman al gen de tau, enseguida se muestran los RNAm maduros que darán lugar a las 6 isoformas de tau en el cerebro adulto. Se muestra además el contenido de aminoácidos y la combinación estructural de cada proteína. Imagen de García Cruz Valeria Melissa, 2019; basada en información de (Park, Lee, Jeon, & Lee, 2018).

Adicionalmente, en el sistema nervioso periférico, se halla una isoforma de tau que contiene una secuencia N-terminal adicional codificada por el exón 4^a, generando una isoforma más pesada ≈ 80 KDa, por lo que es comúnmente denominada “big tau”. Esta variación en la proteína, se debe seguramente a que en tal sistema pueden encontrarse neuronas que proyectan axones bastante largos y con un diámetro amplio (Andreadis, A., Brown, W., Kosik, 1992).

3.3.2 FUNCIÓN

Al unirse a los microtúbulos, desempeña una función importante en su ensamblado y estabilización (Garzía & Godent); tiene papel en la protección microtubular ante cortes que pueda sufrir (Jean & Baas, 2013); participa en la regulación de la función sináptica, ya que una incorrecta función de tau debido a un estado hiperfosforilado, deriva en una baja eficiencia de tal conectividad (Kimura et al., 2014). Por otro lado, tau tiene un papel destacado en el transporte a través de microtúbulos, ya que inhibe la actividad de kinesina y tiende a redirigir a la dineína en dirección reversa, mientras que a una concentración 10 veces mayor de tau, respecto a la concentración que inhibe kinesina, también se ve inhibida, lo que indicaría que hay una modulación de estas proteínas que puede ser regulada por tau (Dixit, Ross, Goldman, & Holzbaur, 2008). Adicionalmente participa en la activación de las MAP cinasas (Leugers, Koh, Hong, & Lee, 2013), en la protección de la integridad del DNA y RNA neuronal ante condiciones de estrés debido a especies reactivas de oxígeno (Violet et al., 2014), así como en la regulación de la señalización inducida por insulina (Marciniak et al., 2017).

Tau regula su unión a microtúbulos a través de sus regiones repetitivas ubicadas en el C-terminal, de hecho, la región que se ha identificado con mayor potencia en la inducción de la polimerización microtubular, es la región comprendida entre las repeticiones 1 y 2 (R1-R2), conformada por la secuencia de aminoácidos $_{274}KVQIINKK_{281}$ presente mayormente en las isoformas con 4R, y que al parecer, incrementa hasta 40 veces la afinidad en el ensamblaje microtubular (Buée et al., 2000).

Comúnmente, la región N-terminal es referida como el dominio de proyección, ya que al interaccionar la proteína con los microtúbulos, éste se direcciona hacia el espacio intracelular, esto posiblemente a repulsión electrostática; éste hecho al parecer mantiene la separación entre microtúbulos en el axón, lo cual a su vez, puede incrementar el diámetro axonal. Por otro lado esto le permite interaccionar con otros elementos del citoesqueleto así como con la membrana plasmática (Laurent, Buée, & Blum, 2018) (Arendt et al., 2016). Aunado a lo anterior, la región rica en prolinas de tau, parece estar inmersa en la interacción con el dominio SH3 de la fosfolipasa C y de la familia de proteínas Src (nRTKs), como Fyn, lo que nos hablaría de un papel en la vía de señalización de fosfolipasa C, y en la señalización para modificar la forma celular a través de la acción sobre el citoesqueleto de actina (Buée et al., 2000). Por otro lado, se han hallado interacciones de tau con proteínas no plegadas, tal como α -sinucleína y TDP-43, que se han relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas (Arendt et al., 2016).

Se cree que cada una de las isoformas de tau, podrían tener un rol fisiológico particular, ya que se ha encontrado que su expresión varía durante el desarrollo y, por otro lado, parece ser que las seis isoformas no se expresan de manera equitativa en diferentes grupos neuronales, por ejemplo, mRNAs que contienen el exón 10, no se encuentran en el giro dentado; por lo tanto, se cree que podrían estar distribuidas diferencialmente en subpoblaciones neuronales (Buée et al., 2000).

Otro ejemplo de ello es que las isoformas de tau que contienen 4 repeticiones, promueven el ensamblado de los microtúbulos a una mayor velocidad que aquellas que sólo contienen 3 repeticiones (Takuma et al., 2003) mientras que, por otra parte, las isoformas 4R reducen la ubicación mitocondrial axonal en mayor medida que las 3R. Está descrito que las isoformas de tau con 3R son más eficientes en cuanto al incremento del movimiento retrógrado de mitocondrias axonales, lo que, de manera general, permite observar diferentes efectos en la dinámica de transporte axonal de acuerdo a las isoformas presentes (Stoothoff et al., 2009).

3.3.3 LOCALIZACIÓN

Mayoritariamente, la proteína tau ha sido descrita como una proteína neuronal con mayor presencia en el axón, como se muestra en la figura 2, ésta localización se encuentra regulada por una barrera en la sección inicial del axón, la cual no permite el desplazamiento y difusión de tau hacia el citosol (Konzack, Thies, Marx, Mandelkow, & Mandelkow, 2007), sin embargo, su presencia en las dendritas y en la post-sinapsis, en condiciones fisiológicas y patológicas, ha sido descrita en los últimos años (Ittner et al., 2010). Otros autores han reportado su presencia en el núcleo, principalmente asociada con el nucleolo (C. Liu & Götz, 2013).

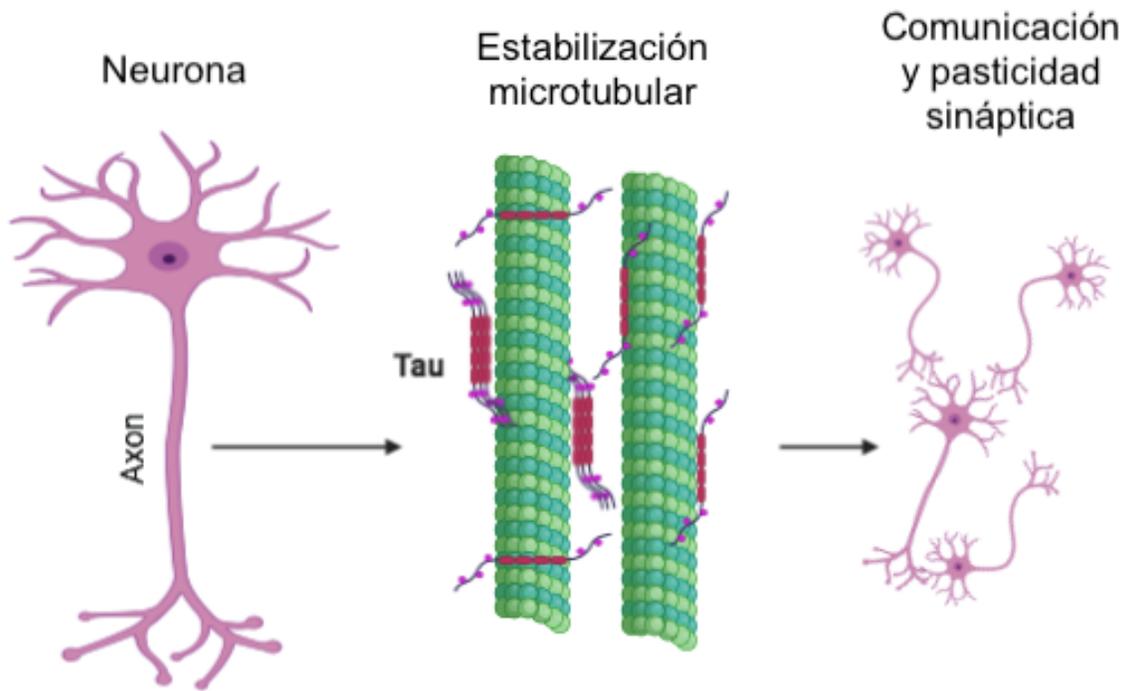


Figura 2. Localización y función de tau. Se muestra la localización de tau en el axón y de manera específica sobre la estructura de los microtúbulos influyendo sobre su estabilidad y con ello contribuyendo a la comunicación celular y a la plasticidad sináptica. Imagen elaborada por García Cruz Valeria Melissa, 2019.

3.4 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE TAU: FOSFORILACIÓN Y ACETILACIÓN

A nivel postraducciona, la proteína tau sufre diversas modificaciones que le brindan una enorme heterogeneidad a sus moléculas individuales, contribuyendo así en la regulación de su función normal y patológica. Algunos ejemplos de las modificaciones que puede sufrir son fosforilación, acetilación, O-glycosilación, ubiquitinización, glicación, nitración, metilación y SUMOilación, entre otras (Arendt et al., 2016).

Un ejemplo de la contribución de las modificaciones postraduccionales de tau son la fosforilación, la glicosilación y la acetilación que al parecer podrían tener una función regulatoria sobre la localización subcelular y la degradación de tau. (Arendt et al., 2016).

3.4.1 FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU

La fosforilación, es una modificación postraducciona en la cual, un grupo fosfato es transferido desde una molécula de alta energía como ATP, a un residuo de serina, treonina o tirosina (por sus características químicas) mediante una enzima cinasa (Nelson, D., Cox, 2017) (Figura 5).

Tau es una fosfoproteína que contiene alrededor de 80 sitios que pueden ser fosforilados (figura 3 y 4), estos sitios están conformados por 45 serinas (Ser), 35 treoninas (Thr) y 5 tirosinas (Tyr) en su isoforma más grande. La mayoría de estos residuos se encuentra en la región de unión a microtúbulos (Arendt et al., 2016).

Tau phosphorylation sites			
Sites only found in AD brains	Sites found in AD and control brains	Sites found in physiologic conditions	Putative sites
Y18	S46	T17	T30
S68	T181	Y29	S61
T69	S198	T39	T63
T71	S199	T50	S64
S113	S202	T52	T76
T123	T205	S56	S129
T153	T212	T95	S137
T175	T217	T101	Y310
T184	T231	T102	T319
S185	S235	T111	T377
S191	S396	S131	
Y197	S400	T135	
S208	S404	T149	
S210	S412	T169	
S214	S413	S195	
S237	S416	T220	
S238		S241	
S258		T245	
S262		T263	
S289		S285	
S356		S293	
Y394		S305	
T403		S316	
S409		S320	
S422		S324	
T427		S341	
S433		S352	
S435		T361	
		T373	
		T386	
		T414	

Figura 3. Sitios de fosforilación de tau. Se muestran los sitios en los que puede ser fosforilada la proteína tau, y se clasifican de acuerdo a su presencia en cerebros normales, cerebros con EA, sitios fosforilados en condiciones fisiológicas y sitios generales. En amarillo se muestran los residuos de interés para el presente proyecto. (L. Martin et al., 2013).

Dicha modificación, modula la distribución celular de tau así como las interacciones necesarias para la regulación del transporte axonal (Xia, Li, & Götz, 2015).

De hecho, el control del grado de fosforilación de tau se relaciona directamente con la modulación de la dinámica de unión a microtúbulos, normalmente pueden encontrarse de 3 a 5 moles de fosfato por molécula de tau (Pasantes, H., Arias, C., Massieu, L., Zentella, A., Tapia, 1999).

Para llevar a cabo la fosforilación de tau, existe un número diverso de cinasas, dentro de las que se encuentran Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), cyclin-dependent kinase 5 (cdk5), cyclin-dependet kinase 2, mitogen activated protein kinases (MAPK) y ERK/MAPK. C-Jun aminoterminal kinase (JNK), non-proline directed kinases como cAMP, MARK2, Nuak1 (Maeda & Mucke, 2016).

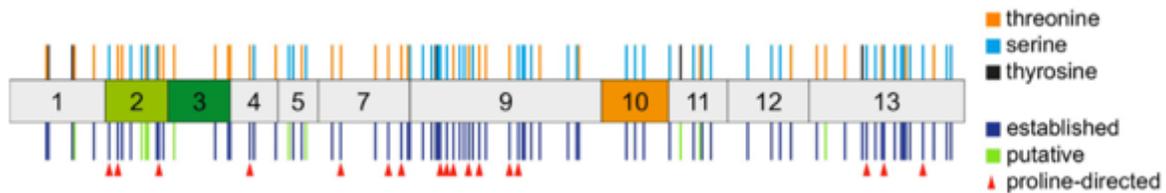


Figura 4. Sitios de fosforilación de la proteína tau. En la imagen se evidencian los sitios conocidos hasta el momento sobre los que tau puede recibir grupos fosfato, a la derecha se muestra el código de colores de acuerdo al aminoácido fosforilado (Arendt et al., 2016).

La regulación de la fosforilación de tau, es llevada a cabo por la acción de proteínas cinasas y fosfatasas; el desbalance en el equilibrio que estas mantienen, pueden llevar a un estado de fosforilación anormal de tau, y con ello contribuir a su mal funcionamiento (L. Martin et al., 2013).

Algunas de las fosfatasas que se encargan de desfosforilar a tau, son PP1, PP2A, PP2B, PP3 y PP5, y una de las que al parecer tiene una actividad del hasta del 70% sobre tau, es PP2A (F. Liu, Grundke-iqbal, Iqbal, & Gong, 2005).

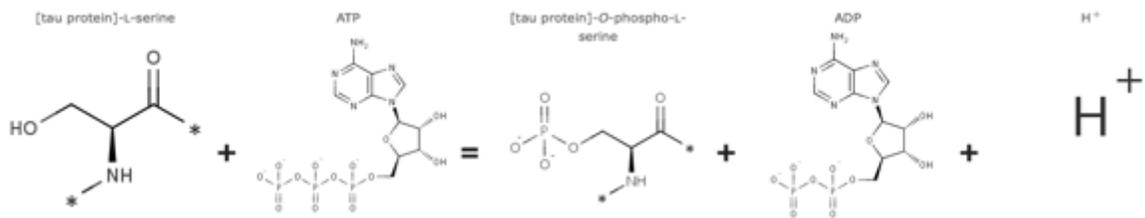


Figura 5. Reacción de fosforilación de tau. El residuo de serina, threonina o tyrosina reacciona con el grupo fosfato gamma de una molécula de ATP para la formación del phospho-L-aminoácido, liberando ADP e iones hidrógeno en la reacción (“Uniprot,” 2019).

La fosforilación, regula tanto las funciones normales como patológicas de tau; dos de los sitios fosforilados de tau que son de particular interés, son las ser199/202, ya que se han visto implicados como sitios relacionados con la EA, tales sitios son fosforilados por la cinasa GSK3 β ; otro de los residuos en los que se ha visto una regulación que facilita la unión a microtúbulos, es la Thr50 (Feijoo, Campbell, Jakes, Goedert, & Cuenda, 2005).

3.4.2 ACETILACIÓN DE LA PROTEINA TAU

La acetilación de lisinas, es una modificación postraduccional en la que un grupo acetilo es añadido a residuos de lisina mediante una enzima acetilasa (figura 6); el papel de ésta modificación es crucial en la regulación de la actividad propia de la proteína así como en la regulación de la expresión génica, de hecho existen reportes individuales sobre el papel de la acetilación en la regulación de un vasto número de procesos celulares, lo que sugiere que ejerce una fuerte función regulatoria (Choudhary et al., 2009). La principal función de esta modificación, es la neutralización de la carga positiva del aminoácido, cambiando así la función de la proteína, de manera diversa e incluso modificando su habilidad para formar puentes de hidrógeno, lo que repercutiría en su interacción con otras moléculas (Yang, 2004).

Esta modificación, también puede ser impuesta sobre tau, de hecho, se ha encontrado que puede sufrir esta modificación en 23 residuos de lisinas, sin embargo, dependiendo de las condiciones celulares, estas pueden modificarse (S. W. Min et al., 2010). Dependiendo de la lisina que se ha acetilado, puede afectar diferentes aspectos biológicos de tau, como su rotación, agregación, fosforilación y con ello la plasticidad sináptica general (S.-W. Min et al., 2018), de hecho se dice que la acetilación de lisinas equipara a la fosforilación en cuanto a la regulación de diversas funciones celulares incluyendo el metabolismo energético, la señalización celular y la dinámica de citoesqueleto (S. W. Min et al., 2010).

Las enzimas que se encargan de acetilar residuos de lisina específicos, son llamadas acetiltransferasas de histonas (HAT) o lisinacetiltransferasas (Nelson, D., Cox, 2017). La principal acetiltransferasa responsable de la acetilación de tau, son p300 y su

homólogo CBP, de las cuales, se ha reportado que p300 muestra una regulación a la alta en cerebros de personas con AD (Aubry, Shin, Crary, Lefort, & Qureshi, 2015); se ha demostrado que una actividad aberrante de esta misma proteína puede derivar en hiperacetilación de tau, de hecho se ha observado que su inhibición parcial puede suprimir la hiperacetilación de sus sustratos, tal como tau (S. W. Min et al., 2015).

Debido al hallazgo de elevados niveles de acetilación de lisinas de tau en cerebros humanos con tauopatías, se le ha atribuido un papel importante en la promoción de la acumulación y toxicidad de tau (S.-W. Min et al., 2018). De hecho, el residuo lisina 280 (K280) en su estado acetilado e incluso doblemente acetilado, se ha encontrado colocalizado con tau fosforilada en las marañas neurofibrilares de pacientes con EA, de hecho, existen reportes en los que la acetilación de tau facilita el desacomplamiento de tau de los microtúbulos además de facilitar su agregado contribuyendo así a la formación de marañas neurofibrilares (NFTs) (Trzeciakiewicz et al., 2017). Otros reportes mencionan que mecanismos relacionados a lesiones secundarias como estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico y neuroinflamación, pueden activar cascadas que llevarían a un daño neuronal y de la glía persistente causando así acetilación de tau en diferentes residuos de lisina (Lucke-Wold et al., 2017).

De manera contraria, las enzimas encargadas de llevar a cabo la desacetilación de proteínas son conocidas como Desacetilasas de Histonas (HDACs), dentro de las cuales se incluyen a las sirtuinas (SIRTs), las cuales, son una familia de enzimas cuya actividad se ha relacionado con el aprendizaje, la memoria y con la patogénesis en la EA (Mahady et al., 2018). De manera específica, se ha reportado que la enzima desacetilasa, Sirtuina 1 (SIRT1) es la encargada de reducir la acetilación de tau, por lo que una deficiencia de ésta, contribuiría al estado hiperacetilado de tau, y con ello a la propagación de las patologías relacionadas a tau (S.-W. Min et al., 2018). Ésta enzima, se ve regulada por los niveles intracelulares de NAD⁺ (Imai, S., Guarente, 2014).

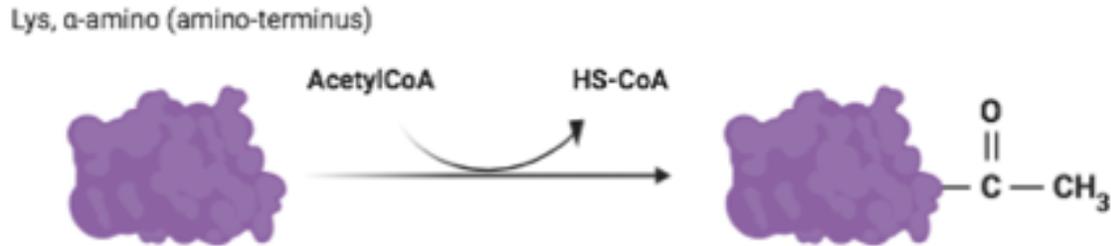


Figura 6. Reacción de acetilación. Los residuos de lisina presentes en tau pueden interaccionar con una acetylCoA para generar un aceto-L-aminoácido. (Imagen basada en Nelson, et.al., 2017, elaborada por Valeria Melissa García Cruz, 2019).

3.4.3 IMPLICACIONES DE LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU: FORMACIÓN DE MARAÑAS NEUROFIBRILARES

La hiperfosforilación de tau, desestabiliza las interacciones de ésta con los microtúbulos, llevando a su inestabilidad y con ello a la presencia de defectos en el transporte axonal, que finalmente llevan a la muerte de la célula. De hecho, el equilibrio de unión de tau hacia los microtúbulos, es modulado por la fosforilación, ya que la introducción de cargas negativas en sitios específicos de tau, serían suficientes para afectar su unión (Kuret et al., 2005). Es bien sabido que la hiperfosforilación de tau y su consecuente agregación, es un marcador patológico encontrado en varias enfermedades neurodegenerativas (Alavi & Soussi-Yanicostas, 2015). La evidencia indica que los agregados de tau se forman primariamente en un pequeño número de neuronas, para luego propagarse hacia otras regiones, resultado después en la neurodegeneración y enfermedad (Goedert & Spillantini, 2017). Dicho estado hiperfosforilado, es resultado de un desbalance en la actividad de proteínas cinasas y fosfatasas (Ludovic Martin et al., 2013). El estado hiperfosforilado de tau parece estar influyendo directamente sobre la solubilidad de tau, facilitando la interacción entre la proteína fosforilada y la no fosforilada, lo que resulta en la formación de agregados amorfos, comúnmente conocidos como pre-marañas, y que se han observado en tejido proveniente de pacientes con EA (Kuret et al., 2005). Seguido de ello, se

presentan cambios conformacionales que llevan a la formación de β -hoja plegada, que después empezarán a agregarse entre sí, hasta formar filamentos más grandes. Se ha visto que las isoformas de tau con tres repeticiones de unión a microtúbulos (3R), forman filamentos helicoidales pareados, mientras que las isoformas con 4R, forman filamentos rectos (Arendt et al., 2016). Posterior a estos filamentos, se presentan las marañas neurofibrilares (NFTs).

Sin embargo, las inclusiones neuronales de tau, pueden presentar diferentes características morfológicas dentro de la diversa gama de enfermedades relacionadas a tau, denominadas tauopatías (Alavi & Soussi-Yanicostas, 2015).

3.5 REGULACIÓN DE LA VÍA DE LA INSULINA/PI3K/AKT Y SU PAPEL EN LA FOSFORILACIÓN DE TAU

La insulina, es una hormona de 51 aminoácidos que es liberada por las células beta del páncreas, esto, en señal a altas concentraciones de glucosa y de nutrientes en la sangre; a su vez, desencadena vías metabólicas que regulan el metabolismo de glucosa y de lípidos (Olivares & Arellano, 2008). De hecho, se encarga de regular tanto enzimas metabólicas como la expresión génica específica. Además de ser esencial para un correcto funcionamiento en plasticidad y memoria hipocampal (Grillo et al., 2015)

El mecanismo mediante el cual inicia la señalización es a través de su unión al receptor de la insulina (IR), localizado en la membrana celular y que está conformado por dos subunidades α , expuestas hacia el espacio extracelular y dos subunidades β transmembranales, las subunidades están unidas entre sí por puentes disulfuro (Olivares & Arellano, 2008) Éste receptor, pertenece a la familia de RTKs (Receptores Tirocin-Cinasa), que conforman una familia que se ubican en la membrana plasmática; en su estructura contienen un dominio de unión al ligando que oscila hacia el espacio extracelular, un sitio enzimático activo en el interior citoplasmático, ambos conectados por un dominio transmembranal. El dominio citoplasmático es una proteína cinasa

que se encarga de fosforilar residuos de tirosina en proteínas blanco específicas (Nelson, D., Cox, 2017). Una vez que se ha unido la membrana a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que llevan a la activación de las subunidades β , este hecho permitirá que se autofosforilen entre ellas en residuos de Tyr (Youngren, 2007).

Posterior a ello, una de las vías por las que sigue la cascada de señalización de la insulina, es la PI3K/Akt, en la que, una vez activo el IR, fosforila al IRS en residuos Tyr para luego convertirse éste en sitios de unión al dominio SH2 de la subunidad p85, lo que aumentará la actividad catalítica de la subunidad p110, ambas pertenecientes a PI3K (Virkamäki, Ueki, & Kahn, 1999). Lo anterior, generará la aproximación de PI3K a su sustrato PIP2, para fosforilarlo y generar así PIP3 y éste a su vez, reclutar proteínas serin-cinasas como PDK, que fosforilará a Akt (PKB) para activarla y reclutarse ambas hacia la membrana plasmática (Patel & Woodgett, 2017). Una de las proteínas sobre la que ejerce función Akt, es GSK3 β , sobre la cual, agrega un grupo fosfato en la Serina 9, con lo que se consigue regular a la baja su actividad, es decir, inactivarla. Uno de los blancos sobre los que GSK3 β ejerce su función de cinasa es tau, de hecho GSK3 β se ha catalogado como una de las principales en lo que a la fosforilación de tau refiere, encargándose de fosforilar 23 de sus 80 residuos fosforilables (Salcedo-Tello, Ortiz-Matamoros, & Arias, 2011), por lo que un desbalance en toda esta vía, podría llevar a la desregulación de GSK3 β y con ello a un desbalance en la fosforilación de tau (ver figura 7). (Salcedo-Tello et al., 2011).

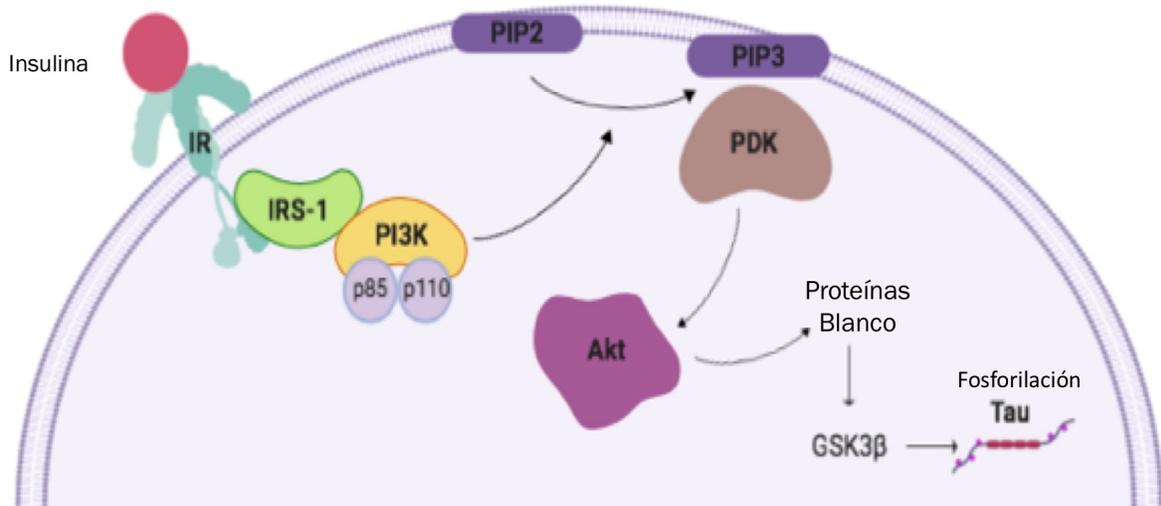


Figura 7. Vía de la Insulina/PI3K/Akt: regulación sobre tau. La hormona insulina se une al receptor de la insulina (IR) lo que generará un cambio conformacional en éste que le permitirá autofosforilarse, activarse y a su vez activar al sustrato receptor de la insulina (IRS-1) fosforilándolo en un residuo de tirosina, una vez activo interactuará con la subunidad p85 de PI3K activando a esta proteína y a su vez activando a la subunidad p110 que fosforilará en la membrana al fosfatidil inositol difosfato convirtiéndolo a fosfatidil inositol trifosfato, éste reclutará a PDK y Akt a la membrana para activarlos, Akt una vez activa ejercerá su función sobre diversas proteínas blanco, una de ellas la cinasa GSK3β a quien regula de manera negativa fosforilándola en Serina9. GSK3β activa puede ejercer su función de cinasa sobre diversas proteínas, una de ellas es Tau. (Patel & Woodgett, 2017). (Imagen elaborada por Valeria Melissa García Cruz, 2019).

3.6 IMPLICACIONES DE LA VÍA mTOR EN LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU.

Se trata de una de las vías cuyo papel es de elevada importancia en la regulación de diversos aspectos celulares, funge como sensor celular de nutrientes, de hecho, un aumento en la energía celular y en la disponibilidad de nutrientes, activa esta vía de señalización; tiene papel para dar lugar a la síntesis de proteínas, la autofagia, en el crecimiento celular, así como en la progresión de padecimientos como la diabetes y el envejecimiento (Saxton, R., Sabatini, 2017).

mTOR, está presente en las células en dos complejos proteicos: mTOR complejo 1 y mTOR complejo 2 (Dowling, Topisirovic, Fonseca, & Sonenberg, 2010); ambos, llevan a cabo sus funciones a través de la regulación de otras cinasas como S6K y Akt, respectivamente (Zoncu, R., Sabatini, D., Efeyan, 2012).

La activación de mTORC1 se efectúa por Akt luego de la activación de la vía de la insulina, una vez activado fosforila a S6K, quien a su vez, regula de manera negativa la vía mediante la fosforilación del IRS-1 en sitios de inactivación (Chamcheu et al., 2019); mientras que entre las actividades de mTORC2, se hallan la proliferación y sobrevivencia, a través de la fosforilación y activación de proteínas como Akt, para luego ésta fosforilar sustratos reguladores del metabolismo tales como GSK3 β (Saxton, R., Sabatini, 2017).

Se ha visto que las dietas altas en grasas, por sí mismas están asociadas con una sobreactivación de mTOR (Dasuri, K., Zhang, L., Kim, S., Bruce-Keller, A., Keller, 2016); en específico, el AP, por sí mismo puede activar a mTOR por mecanismos independientes de la vía de la insulina/Akt/PI3K (Calvo-Ochoa et al., 2017). De manera general, las dietas altas en grasas se relacionan con estados de insulinoresistencia, obesidad y diabetes, en las que se ha encontrado también, hiperactividad de mTOR, y de manera específica, esto se ha hallado también en cerebros de pacientes con EA (Various, 2019).

Respecto a la regulación de mTORC2, ésta sigue bajo estudio, de manera general se sabe que puede ser regulada por factores de crecimiento y que desempeña un papel importante en la reorganización del citoesqueleto mediante la fosforilación y activación de proteínas como PKC (Chamcheu et al., 2019).

3.7 GSK3 β , REGULACIÓN Y PAPEL COMO PRINCIPAL MEDIADOR EN LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU.

Las cinasas, se encargan de transferir un grupo fosfato proveniente de moléculas de alta energía, como ATP o GTP, hacia sustratos específicos. En la reacción, se encargan

de transferir el grupo fosforilo- γ a un aminoácido Ser, Thr, o Tyr, usualmente, o en algunas ocasiones His, pertenecientes a la proteína blanco. Esta reacción, produce la introducción de un grupo cargado, polar, cuyos átomos de oxígeno podran formar puentes de hidrógeno, entre otras interacciones, lo que puede llevar a un cambio conformacional clave para la proteína fosforilada (Nelson, D., Cox, 2017).

La proteína GSK3, es una serine/threonine cinasa que se expresa en tejidos mamíferos y organelos subcelulares; se encarga del control de varios aspectos neuronales, dentro de los que se encuentran el crecimiento de neuritas, la formación de sinapsis, la neurotransmisión y la neurogénesis (Cole, 2012) además de tener un papel fundamental en la proliferación de progenitores neurales, en el establecimiento de la polaridad neuronal, y en la reorganización del citoesqueleto y la neuroplasticidad (Salcedo-Tello et al., 2011). Existen 2 isoformas de esta proteína, la α y la β , pero además de ellas, en el cerebro puede encontrarse una variante de GSK3 β que contiene un inserto de 13 aminoácidos (Patel & Woodgett, 2017).

Sus actividades las regula mediante la fosforilación de una gran cantidad de sustratos que se encuentran relacionados con actividades celulares como la transcripción génica, el metabolismo, la apoptosis, la dinámica de membrana y el tráfico vesicular (Patel & Woodgett, 2017)

GSK3 β se encuentra activa bajo condiciones basales, debido a una fosforilación constitutiva en un residuo de tirosina (Tyr216); por otro lado, su fosforilación en un residuo de serina (ser9) en el n-terminal inhibe su actividad de cinasa, la fosforilación en este sitio puede ser llevada a cabo por proteínas cinasas como Akt, PKA, PKC, y P70S6K, mientras que, por otro lado, proteínas fosfatasas como PP1A y 2A pueden desfosforilar el sitio, llevándola a su activación (Salcedo-Tello et al., 2011). La fosforilación que tiene lugar en ser9, funciona como un pseudosustrato que genera un cambio conformacional en la proteína que previene la interacción de la cinasa con sus sustratos (Figura 8) (Patel & Woodgett, 2017).

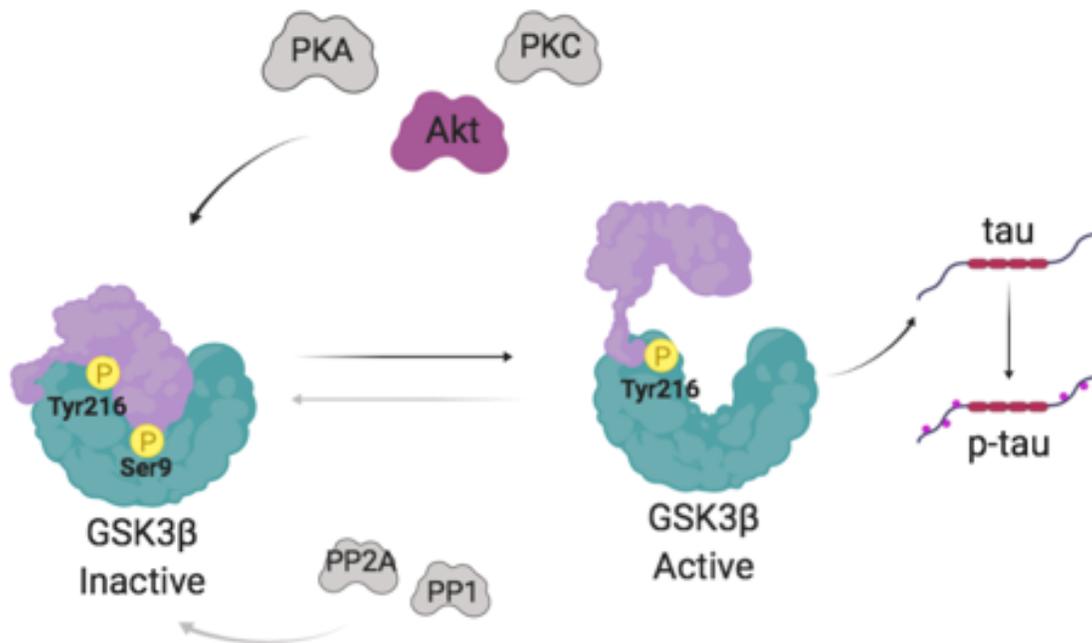


Figura 8. Regulación de GSK3 β y su acción sobre tau. La cinasa GSK3 β se encuentra fosforilada en Tyr216 de manera constitutiva, lo que la mantiene activa; su regulación negativa se modula mediante la participación de cinasas como PKA, Akt y PKC que pueden fosforilarla en Ser9 para llevarla a su estado inactivo, o en su defecto mediante fosfatasas como PP2A y PP1, ésta cinasa puede liberarse de la fosforilación en Ser9 activándose, una vez activa puede ejercer su función sobre proteínas como tau. Información tomada de (Salcedo-Tello et al., 2011).

3.7.1 GSK3 β Y SU PAPEL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Ésta proteína parece jugar un papel importante en la producción de marcadores característicos de la EA, como la formación de marañas neurofibrilares, que se encuentran formadas por la proteína tau en un estado hiperfosforilado; esto es debido a que GSK3 β es una de las cinasas importantes que regula la fosforilación de tau en los residuos implicados en diversas tauopatías, incluida la EA. De hecho, de los 85 sitios en que tau puede ser fosforilada, 25 se han encontrado en cerebros provenientes de pacientes con la EA y de esos 25, GSK3 β fosforila 23. Además, existen estudios que muestran que una sobreexpresión de esta proteína, resulta en

neurodegeneración, por otra parte si existe sobreexpresión tanto de tau como de GSK3, habría un efecto sinérgico llevando a un aumento rápido de su fosforilación (Salcedo-Tello et al., 2011).

3.8 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y FISIOPATOLÓGICAS:

La demencia, es un síndrome que se caracteriza por la falla en la memoria a corto plazo, así como otras funciones cognitivas (Purves et al., 2007); alrededor de 50 millones de personas en el mundo la padecen y un aproximado de 10 millones de casos nuevos se presentan cada año (Various, 2019). La EA es la forma más frecuente de demencia en el mundo, su prevalencia e incidencia mundial, puede encontrarse distribuida de manera casi uniforme, teniendo en los primeros lugares a Europa y América del Norte, seguidos de Latinoamérica y Asia. El riesgo de que este padecimiento se presente, incrementa de manera exponencial con la edad, encontrándose así un incremento prominente alrededor de los 70 y 80 años de edad (Ferri et al., 2005). Por lo que representa un sector importante que se necesita estudiar para comprender y así prevenir y tratar a fondo.

La EA, se caracteriza por dos marcadores histopatológicos, depósitos extracelulares del péptido β -amiloide, distribuido de manera difusa así como en placas neuríticas características, y la proteína tau en estado hiperfosforilado, que se acumula de manera intracelular formando marañas neurofibrilares (NFTs, del inglés, Neurofibrillary Tangles). Por otro lado, pueden también encontrarse cambios adicionales en los que se incluye microgliosis, pérdida neuronal, de materia blanca y de sinapsis. Sin embargo, los mecanismos exactos que llevan a todos estos cambios aun permanecen sin ser elucidados del todo (Reitz & Mayeux, 2014). De manera común, las placas amiloideas suelen presentarse en regiones cerebrales como la amígdala, la neocorteza, y el hipocampo, mientras que las marañas neurofibrilares, tienen lugar en la corteza y el hipocampo, regiones relacionadas directamente con tareas cognitivas como la memoria (Pasantés, H., Arias., C., Massieu, L., Zentella, A., Tapia, 1999).

Basandose en la edad de aparición, la EA puede clasificarse en EA de aparición temprana (<65 años) y de aparición tardía (>65 años) (EOAD y LOAD por sus siglas en inglés Early Onset Alzheimer Disease y Late-Onset AD respectivamente).

La EOAD, generalmente se asocia con una progresión bastante veloz de la enfermedad, así como a una herencia de tipo Mendeliana, en la que se ven involucrados los genes APP, PSEN1 y PSEN2, que se encargan de codificar proteínas relacionadas con el corte de la proteína APP y por lo tanto, con la generación del péptido A β , de hecho, todos ellos se pueden considerar como biomarcadores de la EOAD (Reitz & Mayeux, 2014).

Ésta enfermedad es un padecimiento neurodegenerativo de tipo crónico, el cual, puede caracterizarse por 3 grupos de síntomas. En el primer grupo se incluye la pérdida de la memoria, dificultades en el lenguaje así como una disfunción en las actividades a ejecutar, esto último haciendo referencia a la pérdida de la capacidad de planeación y de coordinación intelectual a ciertos niveles. En el segundo grupo se conjuntan síntomas psiquiátricos y de comportamiento, como depresión, alucinaciones, agitación, etc., mientras que en el tercer grupo, se encuentran dificultades para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana desde la manipulación de objetos hasta la imposibilidad para vestirse, comer, el aseo personal, etc. (Burns & Iliffe, 2009).

4. ANTECEDENTES

En 2014, Calvo-Ochoa y colaboradores, estudiaron el efecto de una dieta alta en grasas y fructuosa en el hipocampo de ratas adultas, encontrando alteraciones en la vía de la insulina, además de alteraciones morfológicas celulares tales como la reducción de neuritas y de sinapsis, así como la activación de procesos inflamatorios demostrados por activación de la astrogliosis, además de un incremento en la fosforilación de la proteína tau en la Ser199/202, con lo que se podría inferir que tales dietas influyen en la neurodegeneración del sistema nervioso central, llevando al desarrollo de enfermedades propias del envejecimiento en donde se ven alteradas funciones cognitivas de importancia, como la memoria.

En 2017, Calvo-Ochoa y colaboradores, Demostraron que el ácido palmítico bloquea la activación metabólica inducida por insulina, además de inhibir la activación de la vía de la insulina/PI3K/Akt y que activa a la cinasa mTOR río debajo de Akt. Por otro lado, se demostró que la exposición neuronal a ácido palmítico, modifica el balance energético celular, ya que se redujo el ratio $NAD^+/NADH$, indicando que el AP puede ser utilizado como recurso energético por este tipo de células. El estudio se llevó a cabo tanto en neuroblastoma humano de la línea MSN así como en cultivo primario de neuronas corticales de embrión de rata.

Salcedo-Tello, Hernández-Ortega y Arias, en 2014, reportan la susceptibilidad a una elevación en la fosforilación de la proteína Tau en ratas de edad avanzada, en los residuos Ser199/202 y ser396/404, mediados por la activación de la proteína GSK3 β dada por la inactivación de la vía canónica de wnt.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de HFD y particularmente de AP ha sido asociado con cambios bioquímicos que contribuyen a la hiperfosforilación de la proteína tau, implicada en enfermedades neurodegenerativas tales como la EA; sin embargo se desconocen los mecanismos mediante los cuales el AP modula dichos cambios, si este estado de hiperfosforilación de tau inducida por el AP es mediado por la activación de GSK3 β y si su acumulación es debida al incremento en la acetilación de tau.

6. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que las dietas altas en grasas, derivan en afecciones a la integridad del cerebro, contribuyendo a su envejecimiento y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, la EA. En dichos padecimientos, se encuentra como una constante la hiperfosforilación de la proteína tau; dicha proteína está directamente relacionada con la generación de filamentos helicoidales que forman las marañas helicoidales, un marcador histopatológico de la EA. Se cree que la exposición al ácido palmítico y su metabolismo induce una activación de GSK3 β a través de causar resistencia a la insulina y desregulación de la vía de la PI3K/Akt en neuronas. Por otro lado se sabe que el AP también altera la función de la desacetilasa SIRT1 lo que podría inducir la acetilación de tau contribuyendo así a su acumulación. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, es estudiar los efectos del AP sobre la fosforilación de la proteína tau a partir de la activación de GSK3 β así como su estado de acetilación. Ésta investigación contribuirá al entendimiento de aspectos que pueden contribuir a la desestabilización de vías de señalización importantes en la regulación neuronal y con ello proveer información para elucidar parte de los mecanismos que llevan a la hiperfosforilación de tau y la probable neurodegeneración.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del ácido palmítico sobre modificaciones postraduccionales de la proteína tau, hiperfosforilación y acetilación y el papel de la cinasa GSK3 β en células de neuroblastoma humano diferenciadas a neurona.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar mediante la técnica de western blot los puntos siguientes:

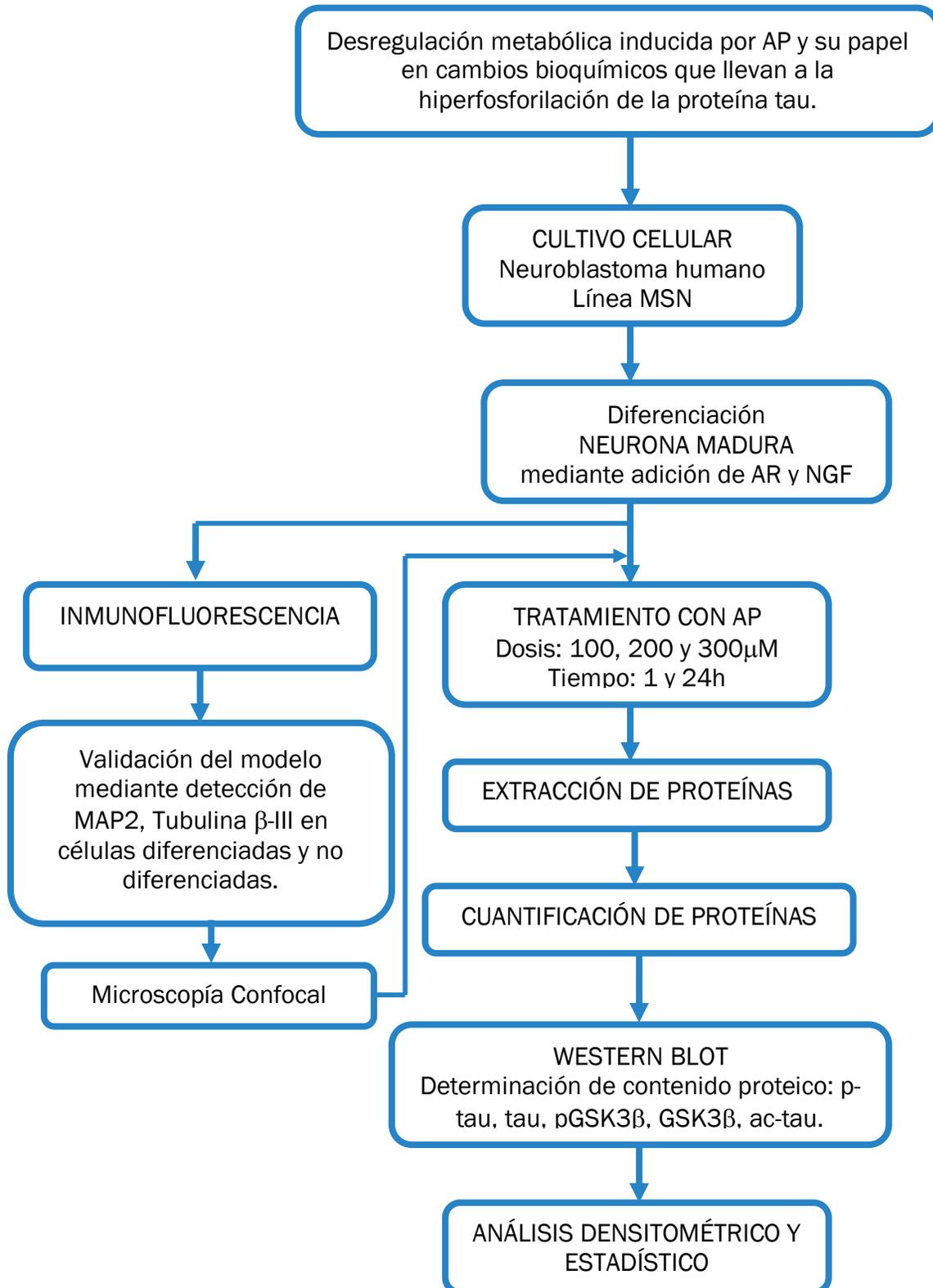
- El efecto de la exposición a largo y corto plazo del AP sobre el contenido proteico de tau y su estado de fosforilación.
- La activación de GSK3 β a tiempos de exposición corto y largo de AP.
- El estado de acetilación de tau a diferentes tiempos de exposición de AP.

8. HIPÓTESIS

La exposición a corto y largo plazo de ácido palmítico induce la hiperfosforilación y acumulación de la proteína tau a través de la activación de GSK3 β y el incremento en la acetilación de tau, respectivamente, en células de neuroblastoma humano.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



9.2 LÍNEA TEMPORAL DE EXPERIMENTACIÓN

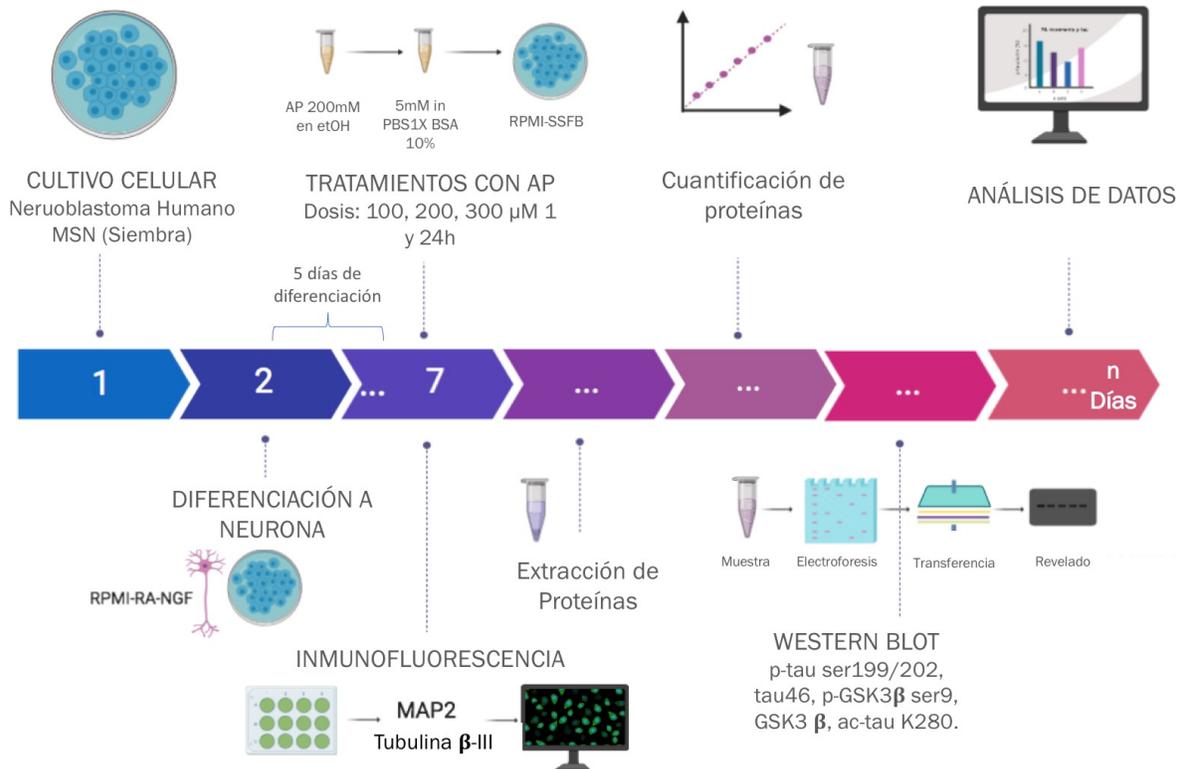


Figura 9. Línea temporal de experimentación. De manera general, como modelo se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano MSN que a las 24h de ser sembrada se diferenció a neurona mediante adición de AR y NGF durante 5 días. Una vez diferenciadas se realizó la caracterización del modelo mediante detección de los marcadores de neurona madura MAP2 y Tubulina β -III por inmunofluorescencia y luego de corroborar la diferenciación, se utilizó el modelo para el proyecto. A neuronas diferenciadas se les expuso ante AP a diferentes dosis (100, 200 y 300 μM) y tiempos (1 y 24h). Pasado el tiempo de exposición se extrajeron y cuantificaron las proteínas totales para luego analizar los niveles de las proteínas de interés (p-tau, tau, p-GSK3 β , GSK3 β , ac-tau) mediante WesterBlot. (n en este diagrama significa número de días cualesquiera).

9.3 CULTIVO CELULAR

La línea celular de neuroblastoma MSN de origen humano, se conservó en viales con contenido de glicerol congelados en nitrógeno líquido para su preservación. Se realizó la descongelación del vial a utilizar y se realizó la siembra de células cajas Petri de 35 mm con una confluencia de 400 000 células por caja, a las que posteriormente se adicionó para su mantenimiento, crecimiento y adherencia, 2 mL por caja de medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino. Se incubaron en una atmósfera de CO₂ 5 %/ O₂ 95% a 37°C.

9.4 DIFERENCIACIÓN CELULAR, NEUROBLASTOMA A NEURONA.

Para el propósito de la obtención de un fenotipo de neurona madura para la réplica de las células del organismo estudiado, 24 horas después de la siembra se procedió a la diferenciación de neuroblastoma a neurona mediante el reemplazo del medio por medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 adicionado con una dosis de 10 µM de ácido retinoico (AR) y factor de crecimiento nervioso (NGF) en una dosis de 50 ng/mL. Dicho medio de cultivo se reemplazó cada 2 o 3 días dependiendo de la confluencia celular y de la acidificación del medio. Éste proceso, tuvo lugar durante 5 días, durante los cuales las células se mantuvieron en incubación a una atmosfera de CO₂ 5 %/ O₂ 95% a 37°C. Una vez completados los 5 días, las células se sometieron a los respectivos tratamientos.

9.5 PREPARACIÓN DEL ÁCIDO PALMÍTICO

Se preparó una solución Stock a una concentración 200 mM de AP diluido en etanol absoluto (Solución A), la cual se mantuvo en congelación hasta su uso. A partir de ella se obtuvo una dilución 5mM en PBS 1X con 10% de albúmina bovina sérica (BSA, Sigma Aldrich) (Solución B); ésta solución, una vez preparada se colocó en baño María

con agitación ocasional a 40°C hasta que el AP se solubilizó completamente (Aproximadamente 2 h). A partir de esta solución, se colocó la cantidad necesaria a cada cultivo para tener una dosis de 100, 200 y 300 μM de AP para completar con el medio de cultivo neurobasal RPMI sin suero fetal bovino, un volumen total de 2000 μL ; durante 1 y 24 h.

Para el vehículo se utilizó una solución 100 μM de etanol absoluto diluida en PBS1X BSA 10% (Solución C). El resumen de las soluciones preparadas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de los tratamientos aplicados al modelo de estudio.

Solución	Composición
Solución A	Solución de AP 200 mM en etanol absoluto.
Solución B	Dilución 5mM de A en PBS1X-BSA 10%.
Solución C	Solución 100 μM de etanol absoluto en PBS1X-BSA 10%.

9.6 TRATAMIENTOS CON ÁCIDO PALMÍTICO PARA LA CURVA DOSIS-RESPUESTA.

Una vez alcanzado el fenotipo de neurona en los cultivos (5° día de tratamiento de diferenciación), y observando una confluencia de aproximadamente 80% se aplicaron los tratamientos.

Se realizaron los experimentos, en donde cada n se trató de un experimento independiente (células provenientes de un pase celular), y dicho experimento contenía un total de 5 réplicas técnicas. En total se trabajaron de 3 a 8 experimentos independientes, es decir células provenientes de 3 a 8 pases celulares diferentes.

Para el tratamiento con ácido palmítico, se procedió al cambio de medio por medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 sin suero fetal bovino y se agregó una dosis de 100, 200 y 300 μM de la solución B (ácido palmítico en etanol-PBS1x-BSA 10%); una dosis

de 100 μM de la solución C para el vehículo y sin ningún tratamiento para el control. Las especificaciones para los tratamientos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones de los tratamientos aplicados al modelo de estudio.

EXPERIMENTO INDEPENDIENTE (n)				
TRATAMIENTOS (Réplicas técnicas)				
CONTROL	VEHÍCULO	100 μM	200 μM	300 μM
RPMI-SFB	RPMI-SFB+Solución C (Apartado 9.4)	RPMI-SFB+Solución B (Apartado 9.4)		

9.7 TRATAMIENTOS CON ÁCIDO PALMÍTICO PARA LA CURVA TIEMPO-EFECTO.

Los tratamientos descritos en el apartado anterior, se aplicaron a los tiempos de 1 y 24h.

9.8 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se procedió a la extracción de proteínas de cada una de las réplicas técnicas, para lo cual, se utilizaron 200 μL de buffer de lisis RIPA (HEPES 50 mmol/L, pH 7.7; NaCl 100 mmol/L, PMSF 2mmol/L; NP-40 1%) con inhibidor de proteasas (Complete Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) por cada tratamiento, una vez agregado se realizó un raspado a fin de obtener un gel viscoso conteniente de las células, que fueron traspasadas a un tubo Eppendorf estéril, para luego someter el contenido a 3 sonicaciones a una

amplitud de 40, durante 3 s, a 4°C. El homogenado obtenido se sometió a centrifugación a 14 000 rpm 20 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se desechó el pellet. El sobrenadante se mantuvo en congelación hasta sus usos posteriores.

9.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se procedió a realizar la cuantificación de proteínas contenidas en el sobrenadante obtenido en el proceso descrito previamente, mediante colorimetría UV/VIS con el kit BCA (Kit BioRad DC protein assay). Se describe brevemente. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina a concentraciones conocidas (2, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y de la muestra problema se utilizaron 3 μL con 3 réplicas de cada muestra. Se colocaron en una placa de Elisa de 96 pozos, posteriormente a cada pozo se le agregaron 25 μL del reactivo A' (reactivo S + reactivo A (Solución alcalina de tartrato de cobre) y 200 μL del reactivo B (Reactivo de Folin), se dejaron reposar durante 15 minutos, para luego realizar la lectura de la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 640 nm para luego realizar el cálculo de la concentración mediante la ley de Lambert&bear y sustitución de datos en la ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración.

9.10 WESTERN BLOT

Se tomó del sobrenadante obtenido mediante la descripción previa (apartado 9.7) la cantidad del μL necesarios para cada proteína de interés (Tabla 1). Las muestras se prepararon con 50% de buffer de carga (Laemmli buffer: 125mM Tris/HCK; 2.5% 4% SDS; 20% glicerol, 2% ditiotreitól, 5% β -mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol; pH 6.8). Posteriormente fueron homogenizadas y sometidas a ebullición (100°C) en Baño María durante 10 min. Pasado ese tiempo, se frenó el hervor mediante shock térmico a 4°C. Las muestras, se separaron mediante electroforesis en gel de acrilamida a una

concentración del 12% que fue corrido a 120 V, durante tiempos variables, de acuerdo a las características fisicoquímicas de las proteínas de interés. Las proteínas separadas obtenidas en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Hybond ECL, Buckinghamshire, England), a 50 mA durante 15h a 4°C, o a 200 mA 2h, 4°C. Las membranas se revelaron con el reactivo Ponceau y luego de ello fueron lavadas de éste con TBS 1X Tween 0.1%. Posteriormente, se llevaron a bloqueo con BSA 5% (Sigma Aldrich) en TBS 1X Tween 20 0.1%, en agitación lenta y temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado el tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS 1X Tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la respectiva solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (Tabla 3). Al día siguiente, se retiró la solución del anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 5 min., completados éstos, se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa diluido en la solución de bloqueo respectiva, 2 h a temperatura ambiente y en agitación lenta. En seguida, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación rápida y se procedió al revelado mediante quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Billerica, MA, USA) en placas fotográficas (Kodak X-OMAT film). Las especificaciones sobre la cantidad de proteína, los anticuerpos utilizados, su dilución, solución de bloqueo, etc., se muestran en la tabla 1.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la técnica de western blot.

Anticuerpo	Cantidad (µg)	Gel SDS-Page	Ac 1° / Dilución	Ac 2° / Dilución
Tau total (46)	80 µg	12 %	Mouse monoclonal anti-Tau46 (1:1000 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA).	Antimouse IgG-HRP (Horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. (1:10 000).
Tau (Ser-199/202)			Rabbit polyclonal anti-Tau Phosphoserine 199/202 (Millipore, Temecula, CA, USA). (1:1000)	Anti-rabbit IgG-HRP (Horseradish peroxidase conjugated; Cambridge, UK). (1:15

				000).
GSK3- β - pSer-9	50 μ g		Rabbit polyclonal anti-GSK3- β Serine9 (1:1000 Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA).	Anti-rabbit IgG-HRP (Horseradish peroxidase conjugated; Cambridge, UK). (1:15 000).
GSK3- β total			Rabbit monoclonal anti-GSK3- β (27C10) (1:1000 Cell Signaling)	Anti-rabbit IgG-HRP (Horseradish peroxidase conjugated; Cambridge, UK). (1:10 000).

9.11 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células una vez diferenciadas, fueron fijadas con PFA al 4% sobre hielo durante 20 minutos, enseguida, las células fueron lavadas 3 veces por 5 min con PB 0.1M Tritón X-100 0.3% a 4°C. Posteriormente, las células se permeabilizaron con PB 0.1M Tritón X-100 0.3% durante 10 min a temperatura ambiente y se incubaron con solución de bloqueo (PB 0.1M/Tritón X-100 0.3% / BSA 0.5%) 2h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de bloqueo, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios, diluidos en la solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Los controles negativos consistieron en la omisión del anticuerpo primario. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 2 lavados de 3 minutos cada uno con solución PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% y se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios respectivos, diluidos en solución PB 0.1M Tritón X-100 0.3%, 2h a temperatura ambiente, luego de las cuales, las células se lavaron 2 veces durante 3 minutos con solución PB 0.1M Tritón X-100 0.3%. Posteriormente se disolvieron 10mg de DAPI fluorescent en 2mL de H₂O bidestilada estéril (stock solution), a partir de ella se elaboró una solución 300 μ M, de la que se obtuvo una dilución 1:2000 en PB 0.1M/Tritón X-100 0.3% / BSA 0.5%, con la que se incubaron las células durante 10 minutos aisladas de la luz. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje para fluorescencia Dako (Dako fluorescent mounting medium, North America, Inc., Carpinteria, Ca, USA). Para la captura de imágenes se utilizó el microscopio confocal

Nikon A1R+, objetivo 20X, aumento digital 4X y para su procesamiento se utilizó el programa NIS-Elements Viewer e ImageJ. Las concentraciones y diluciones de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Ac/Dilución
Anti MAP2AB. (Mouse monoclonal anti-MAP2A/2B). Sigma Aldrich.	(1:500)
Anti β -tubulin III. (Rabbit polyclonal anti-tubulin β -III). Sigma Aldrich.	
Alexa fluor 488 (Mouse polyclonal antibody) ThermoFisher Scientific.	1:700
Alexa fluor 488 (Rabbit polyclonal antibody) ThermoFisher Scientific.	

9.12 ANÁLISIS DE DATOS DE WESTERN BLOT

Los resultados obtenidos en las placas, se analizaron mediante densitometría con ayuda del software ImageJ. Los datos se normalizaron con un control de carga de cada experimento independiente, obteniendo así la proporción respectiva, que se utilizó para hacer las comparaciones, en donde se expresó como porcentaje. Para el análisis del tratamiento a 1 hora sólo se tomaron en cuenta la dosis de 200 μ M, ya que se observó que a dicha dosis se generaron efectos evidentes a 24 h de exposición y se buscó comparar si los efectos podían observarse desde etapas tempranas de exposición.

10. RESULTADOS

10.1 VALIDACIÓN DEL MODELO UTILIZADO

Inicialmente, se validó el modelo a utilizar: células de neuroblastoma humano de la línea MSN diferenciadas a neuronas mediante la adición de AR y NGF al medio de cultivo.

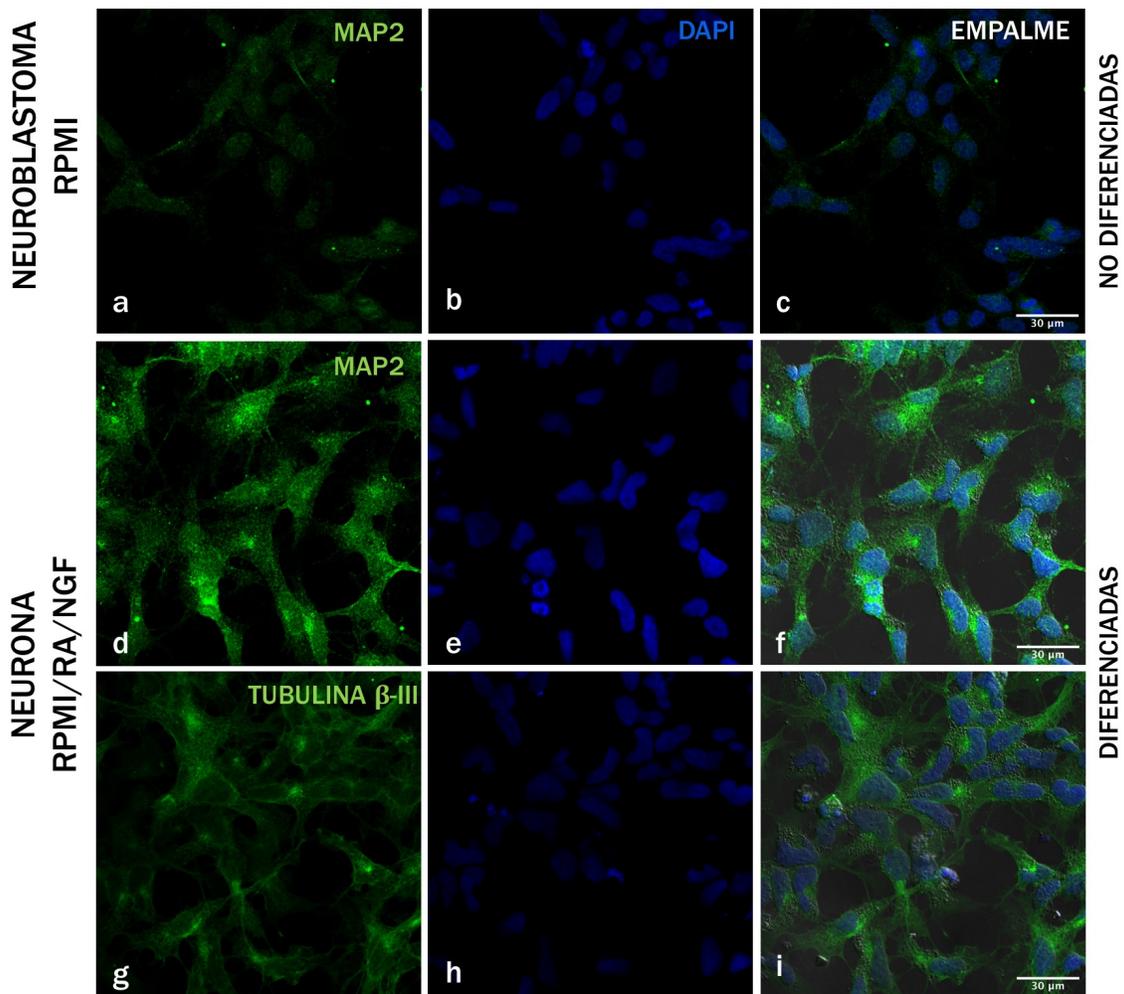


Figura 9. Cultivo de células de Neuroblastoma humano de la línea MSN.

Imágenes de microscopía confocal de células de neuroblastoma humano de la línea MSN inuomarcadas contra la proteína MAP2 (verde) y núcleos celulares DAPI (azul) a 5 días del sembrado sin adición de AR y NGF (c); y de células de neuroblastoma humano diferenciadas a neuronas luego de 5 días de incubación con AR y NGF inuomarcadas contra la proteína MAP2 y Tubulina β -III (verde) y núcleos celulares con DAPI (azul) (f,i). (Objetivo 20X, Aumento Digital 4X).

10.2 LA EXPOSICIÓN A LARGO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO INCREMENTA LA HIPERFOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.

Para estudiar si el AP tenía efecto en exposición de 24 h sobre la fosforilación de la proteína tau, se verificó el contenido proteico de tau fosforilada en los sitios serina199/202, ello mediante la técnica de western blot, luego del cultivo y tratamiento celular con AP a las dosis de 100, 200 y 300 μM , la extracción de la fracción proteica y la subsecuente identificación de la proteína fosforilada.

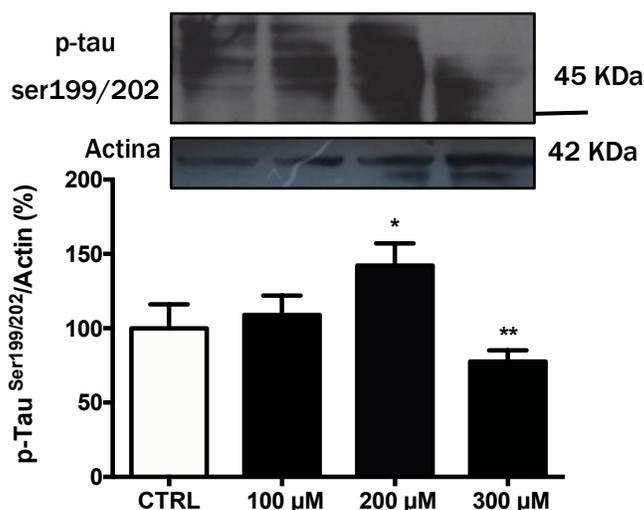


Figura 10. El AP incrementa p-tau a 24h. Western Blot representativos de tau fosfo-Ser199/202; en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado bajo tratamiento a largo plazo (24h) con AP a diferentes dosis. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student. * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

En la figura 10, se observa un incremento de tau fosforilada en la serina 199/202 a una dosis de AP 200 μM , mientras que a 300 μM se identifica una notoria disminución en su fosforilación.

10.3 LA EXPOSICIÓN PROLONGADA AL AP PARECE NO AFECTAR LOS NIVELES PROTEICOS DE TAU.

Al identificarse dichos cambios, se analizó si la fosforilación podría deberse al aumento en el contenido de la proteína tau o a un aumento específicamente sobre la fosforilación en los sitios de interés. En la Figura 11 se muestra el Western blot representativo del contenido total de tau y no se encontraron cambios significativos en el contenido a ninguna de las concentraciones estudiadas.

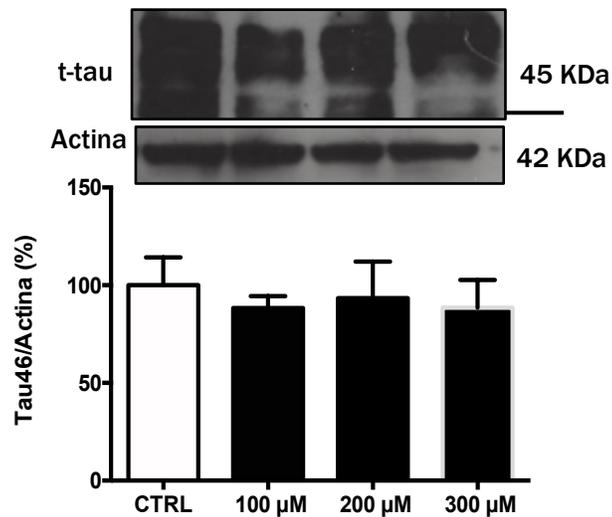


Figura 11. El AP no modifica el contenido total de tau a 24h. Western Blots representativos de tau46. Se identifica el carboxilo terminal de la proteína, por lo que se trata de la proteína total, en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado bajo tratamiento a largo plazo (24h) con AP a diferentes dosis. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student.

10.4 LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU ANTE LA EXPOSICIÓN DE AP A LARGO PLAZO PARECE ESTAR MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA CINASA GSK3 β .

Al de observar un incremento en la fosforilación de tau, se estudio si la cinasa GSK3 β , también se activaba en presencia del AP. Se analizó el contenido proteico de la proteína GSK3 β fosforilada en Serina9 utilizado comunmente para verificar su activación ya que la fosforilación en este sitio la inactiva, por lo que al verse disminuida nos estaría hablando de una activación. Efectivamente encontramos que con 100 y 200 μ M de AP, la pSer9 disminuye indicando activación de esta cinasa (Figura 12).

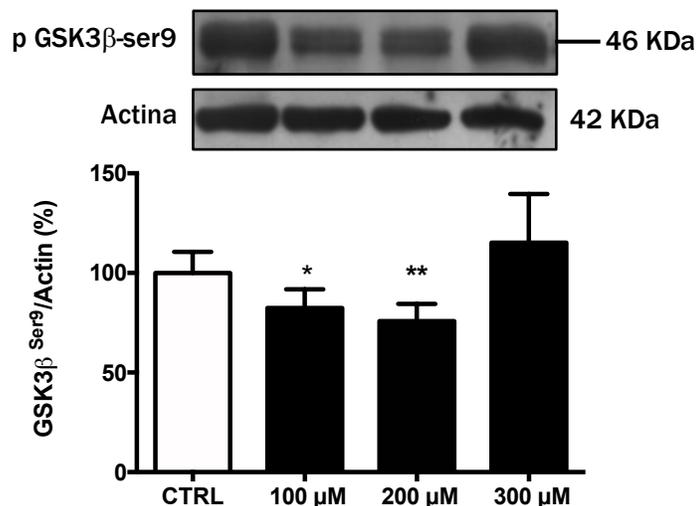


Figura 12. El AP activa a GSK3 β a 24h. Western Blots representativos de fosfo-GSK3 β Ser9, en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado, bajo tratamiento a largo plazo (24h) con AP a la diferentes dosis de AP. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 8 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

10.5 EL AP NO MODIFICA EL CONTENIDO TOTAL DE GSK3 β A LARGO PLAZO

Al hallar un incremento en la proteína activa de GSK3 β , se verificó si existían cambios en el contenido total de la cinasa en presencia del AP. La figura 13 muestra que la exposición neuronal con AP no induce alteraciones en el contenido de GSK3 β .

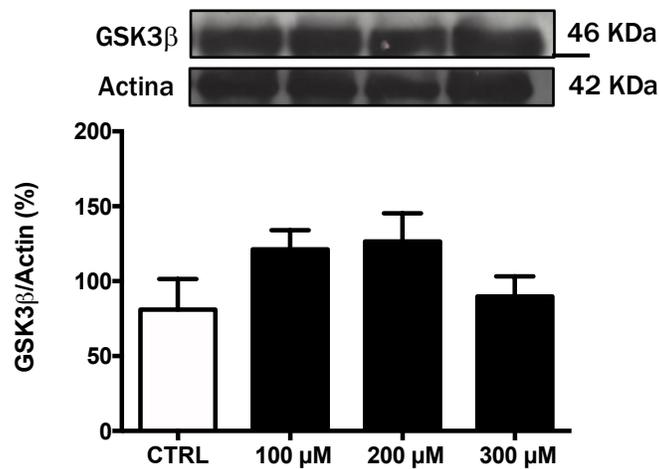


Figura 13. El AP no modifica a GSK3 β a 24h. Western Blots representativos de GSK3 β , en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado, bajo tratamiento a largo plazo (24h) con AP a la dosis de 100, 200 y 300 μ M. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student.

10.6 LA EXPOSICIÓN A CORTO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO INCREMENTA LA HIPERFOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU.

Debido al incremento en la fosforilación de tau ante la exposición de AP a largo plazo a la dosis de 200 μ M, se quiso identificar si este efecto se generaba incluso desde la exposición temprana a AP, es decir a un corto plazo (Figura 14), observándose que desde la exposición temprana a dicho ácido graso saturado, se ve un incremento en la fosforilación de tau en p-Ser199/202, y además de igual forma no se observaron cambios en el contenido de la proteína total (Figura 15).

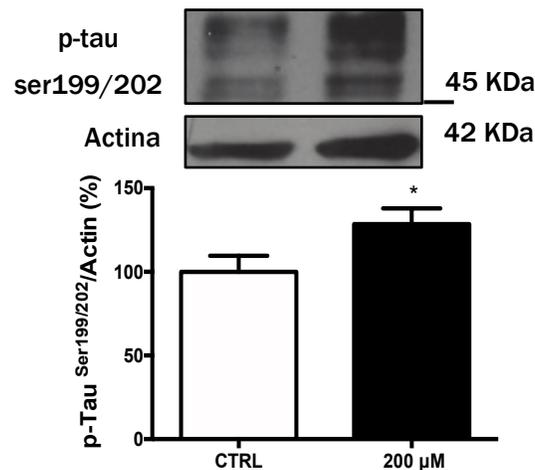


Figura 14. Incremento de p-tau ante AP a 1h. Western Blots representativos de fosfo-tau Ser199/202 bajo tratamiento a corto plazo (1h) con AP a la dosis de 200 μ M, en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student. * $p < 0.05$.

10.7 LA EXPOSICIÓN A CORTO PLAZO DE ÁCIDO PALMÍTICO NO MODIFICA EL CONTENIDO DE TAU

Se procedió a realizar la cuantificación del contenido total de la proteína tau ante una exposición de 1h de AP, con la finalidad de observar si los cambios encontrados previamente se debían a un aumento en los niveles totales de dicha proteína y por ende hubiese mayor cantidad de sustrato para ser fosforilado, o si los cambios se debían al aumento en la modificación postraduccional como tal; luego de analizar los resultados de manera estadística, encontramos que no hubo modificación alguna a niveles totales de tau.

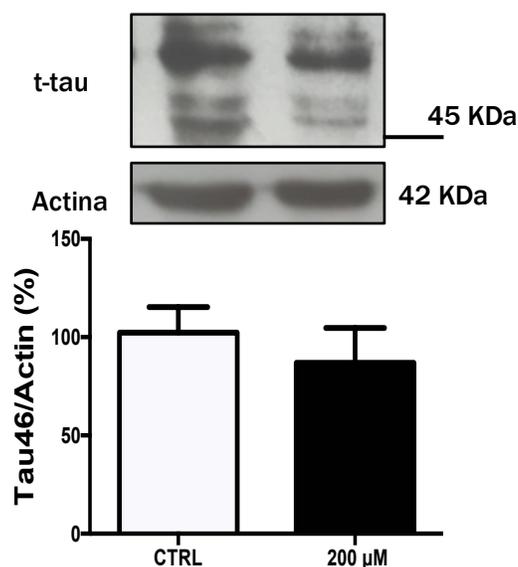


Figura 15. Tau no se modifica bajo 1h de AP. Western Blots representativos de tau46 en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado bajo tratamiento a corto plazo (1h) con AP a la dosis 200μM. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student.

10.8 LA HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU ANTE LA EXPOSICIÓN DE AP A CORTO PLAZO NO SE ASOCIA CON LA ACTIVACIÓN DE GSK3 β .

A continuación analizamos si los efectos en la fosforilación de tau ante una exposición a corto plazo de AP, estarían siendo regulados de manera general por la misma cinasa, por lo que se cuantificó la activación de GSK3 β a la dosis que produjo la mayor fosforilación de tau (200 μ M). Interesantemente, encontramos que a 1 h de exposición al AP no se ven alterados los niveles de fosfo-GSK3 β Ser9 con respecto a las células control.

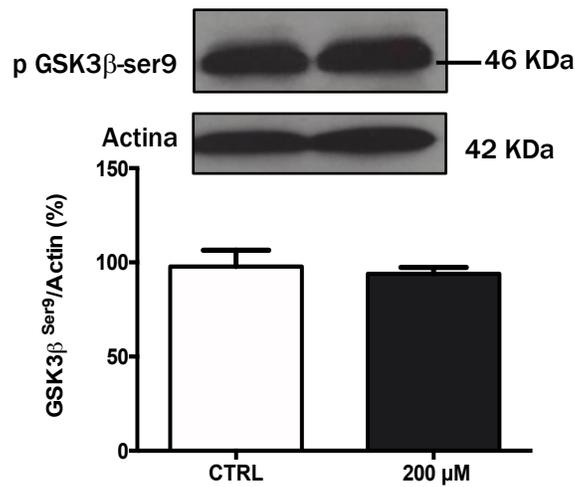


Figura 16. EL AP a 1h no activa a GSK3 β . Western Blots representativos de fosfo-GSK3 β Ser, en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado bajo tratamiento a corto plazo (1h) con AP a la dosis de 200 μ M. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 6 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométrico normalizado con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student.

10.9 EL AP NO AFECTA LOS NIVELES PROTEICOS DE GSK3 β .

De manera similar, el contenido total de GSK3 β ante la exposición de AP a corto plazo, en donde de igual forma, no sufrió variaciones como se muestra en la figura 17.

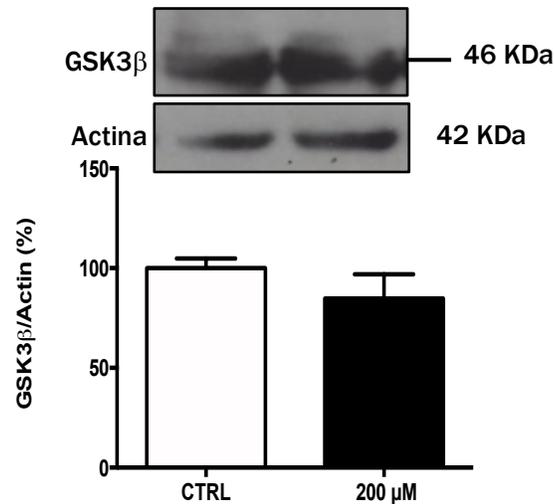


Figura 17. El AP no modifica a GSK3 β . Western Blots representativos de GSK3 β , en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado, bajo tratamiento a corto plazo (1h) con AP a la dosis de 200 μ M. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con actina como control de carga (banda de 42 KDa). Prueba t de Student.

10.10 EL AP INCREMENTA LA ACETILACIÓN DE TAU ANTE UNA EXPOSICIÓN A CORTO Y LARGO PLAZO.

Dado que se ha demostrado que el tratamiento con AP depleta los niveles de NAD⁺, lo que a su vez reduce los niveles de la desacetilasa SIRT1 (Flores-León y cols., 2018), se estudió si había aumento en la acetilación de tau en K280, además, de que esta modificación postraduccional, podría estar contribuyendo a la acumulación de la proteína tau fosforilada, al impedir su marcaje con ubiquitina y con ello, la no degradación proteosomal. Se encontró que en ambos casos de tratamiento, corto (Figura 17) y largo plazo (Figura 18), hay un aumento significativo de la acetilación de tau.

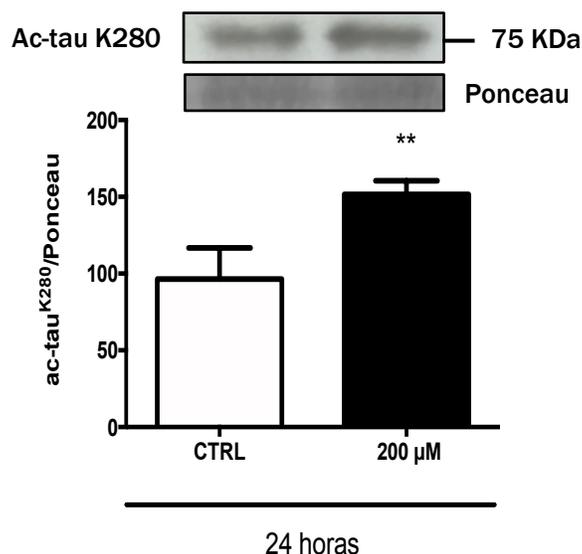


Figura 18. El AP incrementa la acetilación de tau a 24h. Western Blots representativos de ac-tau K280 en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado, bajo tratamiento a largo plazo (24 h) con AP a la dosis de 200 μM. Las barras de la gráfica representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con ponceau como control de carga. Prueba t de Student. **p<0.01.

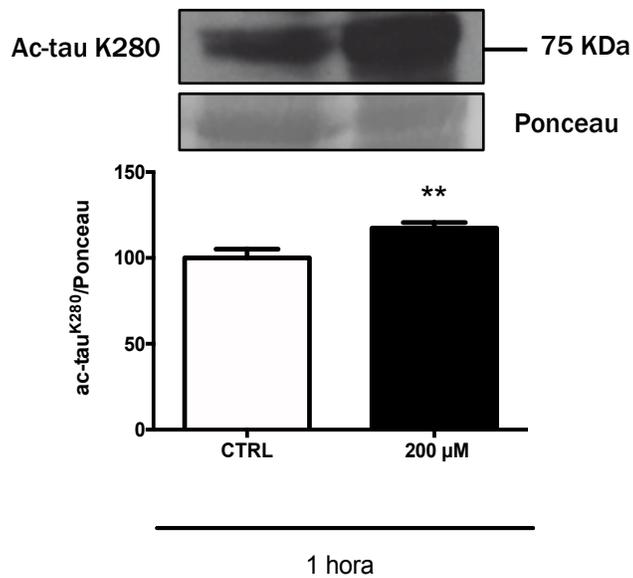


Figura 19. El AP incrementa la acetilación de tau a 1h. Western Blots representativos de ac-tau K280 en cultivos de neuroblastoma humano diferenciado, bajo tratamiento a corto plazo (1 h) con AP a la dosis de 200 μM. Las barras de la gráfica representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, generadas a partir de análisis densitométricos de los niveles de la proteína de interés, normalizados con ponceau como control de carga (banda de 36 KDa, ponceau). Prueba t de Student. ** $p < 0.01$.

11. DISCUSIÓN

Mediante la técnica de Inmunofluorescencia se confirmó que el modelo utilizado corresponde a neuronas humanas con fenotipo de neurona madura al comprobar el aumento en el marcaje de la proteína neuronal MAP2 posterior al tratamiento con AR y NGF. Se puede apreciar en la figura 9 a, b y c (página 53), referente al cultivo sin diferenciar, presencia de núcleos celulares marcados con DAPI (azul) (figura 9b) y ausencia de señal para la proteína MAP2 (figura 9a) en verde, así como ausencia de procesos neuríticos que en conjunto se muestran en el la figura de empalme (figura 9c). Por otro lado, en los cultivos diferenciados (9d-i), luego del incubado con AR y NGF) se observa la presencia de MAP2 mayormente en el soma y dendritas de las neuronas (figura 9d) y Tubulina β III en la totalidad del citoesqueleto (figura 9g) ambas marcadas en verde, aunado con un cambio en la morfología celular evidenciándose el alargamiento de procesos celulares, generándose así el aspecto característico de una neurona humana madura (figuras 9f e i, respectivamente).

El objetivo del presente trabajo, fue estudiar el efecto ante la exposición de AP sobre modificaciones postraduccionales de tau, su acetilación, hiperfosforilación, y la posible participación de GSK3 β . Las dosis elegidas de AP son dosis que se han encontrado presentes en el suero de pacientes que consumen este tipo de dietas y que además han desarrollado algún tipo de patología asociada, tal como diabetes y obesidad, cuyo factor en común es la insulino-resistencia además de la desregulación en la vía metabólica activada por insulina, lo que se ha relacionado directamente con un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la EA (Calvo-Ochoa, y Arias 2015).

La exposición por 24 h al AP indujo cambios en la fosforilación de tau a la dosis de 200 μ M (Figura 10). Este efecto no se acompañó de un incremento en la proteína total (Figura 11), sugiriendo que los cambios observados se deben a un mayor grado de fosforilación de la proteína en residuos asociados a la tau que forma los NFT en la EA. De acuerdo con este hallazgo, previamente en el grupo de trabajo se reportó que el consumo de dietas altas en grasas (HFD), produce una hiperfosforilación de tau en sitios Serina 199/202 en el hipocampo de la rata (Calvo-Ochoa et al., 2014). Algunos

de los sitios relevantes de fosforilación están modulados por la acción de la cinasa GSK3 β incluso de manera constitutiva (Salcedo-Tello, Hernández-Ortega, & Arias, 2014). Debido a ello, se quiso estudiar si la fosforilación que encontramos sobre tau, podría deberse a un aumento en la actividad de GSK3 β , ya que reportes previos sugieren que la modulación de esta cinasa puede verse alterada por una desregulación en la vía de la insulina/PI3K/Akt. De hecho, está demostrado que el AP bloquea dicha vía ante una exposición corta de éste ácido graso, mediante el decremento en la fosforilación de la serina 473 de Akt (Calvo-Ochoa et al., 2017). Se sabe que la vía de la insulina/PI3K/Akt, regula la actividad de GSK3 β mediante la fosforilación de ésta en serina 9 por Akt (Salcedo-Tello et al., 2011), por lo que medimos el contenido de dicha proteína fosforilada en el residuo Ser9, y resultó que efectivamente la exposición durante 24 h con AP reduce esta fosforilación por lo que la enzima se encuentra en un estado de mayor activación (Figura 12). El incremento en la actividad de GSK3 β se logra observar desde la dosis de 100 μ M de AP a largo plazo, pero la fosforilación de tau a esa misma dosis se mantiene sin cambios, por lo que se podría deducir que es suficiente con dosis menores para el inicio de la desregulación de la cinasa, pero no aún para la hiperfosforilación sobre tau. Sin embargo, sería interesante revisar los efectos sobre algunas otras proteínas sobre las que GSK3 β tiene actividad. En referencia al resultado obtenido ante la exposición de 300 μ M de AP, se observó una reducción significativa en la fosforilación de tau, respecto a la tau total, mientras que la actividad de GSK3 β se mantuvo igual respecto al control, es decir, no incrementó, esto podría correlacionarse entre sí, ya que a menor actividad de GSK3 β menos fosforilación de tau (Figuras 10-13), sin embargo, la dispersión de nuestros datos respecto a GSK3 β es amplia, posiblemente debido a que la dosis de 300 μ M de AP, pueden presentarse efectos tóxicos y eventos de desregulación celular debido a ello, ya que se ha reportado que la exposición ante esta dosis induce una reducción significativa de la viabilidad celular (Flores-León, Pérez-Domínguez, González-Barrios, & Arias, 2019). Aunque hasta el momento lo anterior es solo una asociación, se deberá demostrar que la inhibición de la GSK3 β efectivamente bloquea la fosforilación de tau inducida por el AP.

Posteriormente, ya que se sabe que el AP puede bloquear la vía de la insulina/PI3K/Akt, (Calvo-Ochoa et al., 2017), y ya que habíamos observado efectos previos bajo la dosis de 200 μ M de AP (Figura 10), se quiso analizar los efectos a esta misma dosis de AP a corto plazo (1h). Empezamos por analizar si la exposición ante el AP tenía un efecto sobre la fosforilación de tau. Encontramos que los efectos de éste ácido graso saturado comienzan a verse desde la exposición temprana, observándose un incremento significativo en la fosforilación de tau (Figura 14) sin afectarse los niveles totales de la proteína (figura 15). Sin embargo, a pesar de encontrar un incremento en la fosforilación de tau, a 1 h de exposición no encontramos un incremento en la actividad de GSK3 β (Figura 16 y 17), por lo que es posible que a tiempos cortos de exposición, la regulación de la fosforilación de tau se deba a la activación de alguna otra cinasa dentro de las que se podrían encontrar a la PKA que se activa en condiciones de exposición a nutrientes, o incluso a la desregulación de fosfatasas implicadas tales como PP1A y PP2A (Salcedo-Tello et al., 2014). Alguna otra cinasa que pudiera estar implicada es la PKC cuya actividad también se regula por la vía de insulina/PI3K/Akt. Como ya ha sido demostrado, la exposición a corto plazo de AP se asocia con una desregulación en la vía mTOR a través de la activación de S6K (Calvo-Ochoa et al., 2017), vía que se ha relacionado además con la activación de cinasas como PKC (Chamcheu et al., 2019).

Otra de las modificaciones postraduccionales que puede sufrir tau y que además puede contribuir a que no se degrade correctamente es la acetilación (S. Min et al., 2015). Previamente, se había corroborado que el AP podía ser utilizado como sustrato energético por las neuronas, lo que se asocia con una reducción significativa en el contenido de NAD⁺ y un incremento en la actividad metabólica mitocondrial desde la primera hora de exposición al AP a dosis similares (Calvo-Ochoa et al., 2017). La reducción en el contenido del NAD⁺ se ha relacionado con una disminución significativa en la actividad de la desacetilasa SIRT1 a las 24 horas de exposición a dosis similares de AP (Flores-León et al., 2019); además, se ha demostrado que SIRT1 tiene un papel importante en la desacetilación de tau, y que una deficiencia de esta enzima conduce a una hiperacetilación y acumulación de tau (S. W. Min et al., 2010), Los niveles de SIRT1, tanto proteicos como de su mRNA se han visto disminuidos en la

corteza parietal de pacientes con EA, lo que además se ha correlacionado con la deficiencia cognitiva y la acumulación de tau (Mahady et al., 2018). En conjunto, lo anterior podría explicar el aumento que observamos en la acetilación de tau luego de la exposición a corto y largo plazo de AP a 200 μ M (Figura 19 y 18), indicando que un consumo elevado de este ácido graso saturado -lo que es común en una dieta alta en grasas- nos estaría conduciendo hacia diferentes alteraciones post-traduccionales de la proteína tau asociadas con su disfunción observada en la EA.

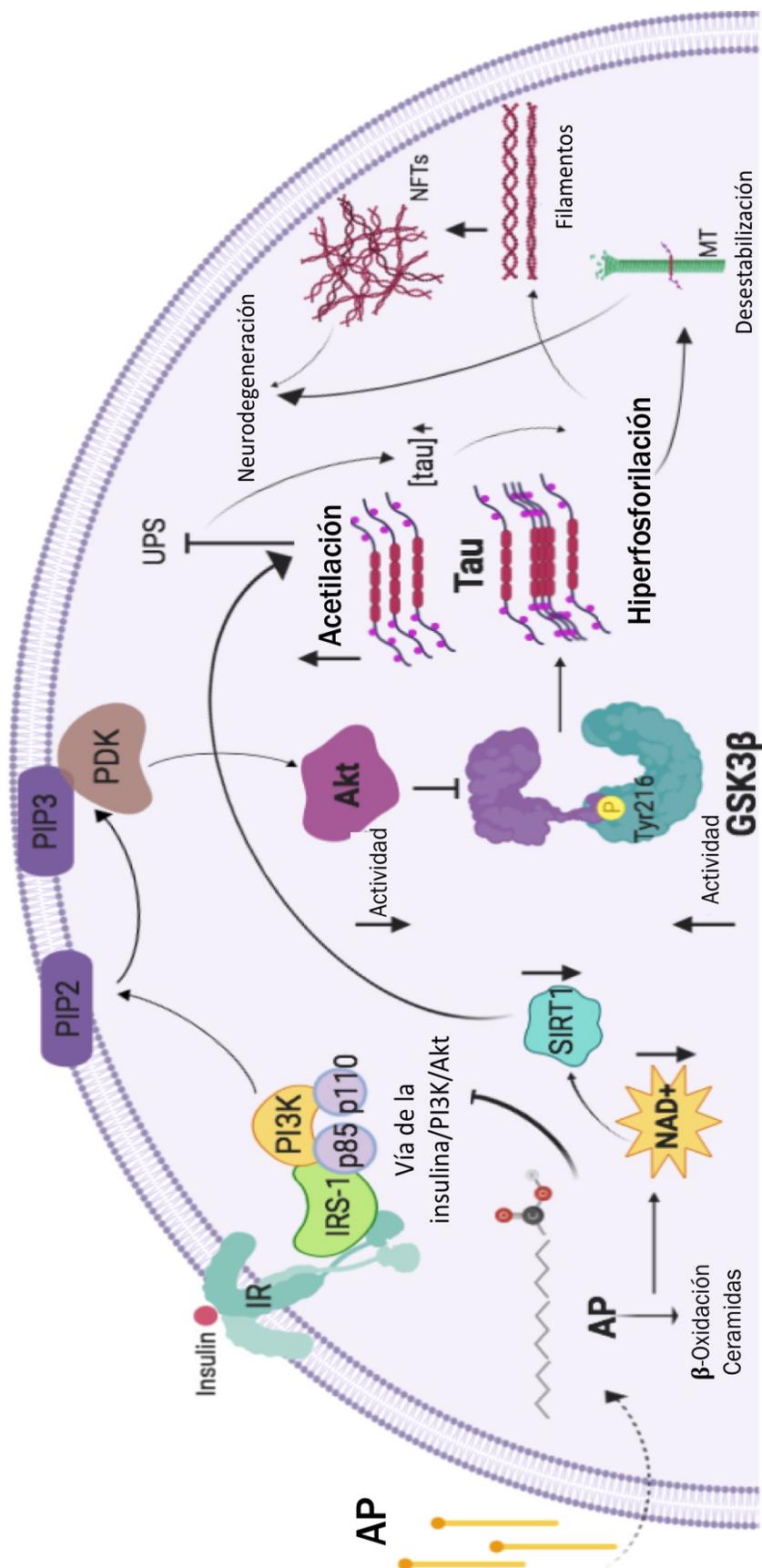


Figura 20. Mecanismo de acción propuesto sobre los efectos del AP en la fosforilación y acetilación de tau y su relación con GSK3β. El ácido palmítico puede estar siendo metabolizado mediante β-Oxidación, lo que conduciría un decremento en los niveles de la coenzima NAD⁺, esto generaría un decremento en el contenido y actividad de la desacetilasa SIRT1, lo que llevaría a un estado de hiperacetilación de tau, bloqueando su degradación por proteosoma y fomentando su acumulación. Por otra parte, se propone que el AP puede estar siguiendo la ruta de la síntesis de ceramidas lo que, en conjunto con la β-Oxidación, estaría llevando a un desbalance en la vía de la Insulina/PI3K/Akt, reduciendo la actividad de Akt, lo que fomentaría el mantenimiento de GSK3β en estado activo, dicha cinasa en este estado podría estar actuando sobre Tau hiperfosforilándola. Todo lo anterior, en conjunto, puede llevar a la desestabilización microtubular, a la formación de filamentos helicoidales, con la formación seguida de marañas neurofibrilares, que de manera conjunta llevaría a la neurodegeneración. (Valeria Melissa García Cruz, 2019).

12. CONCLUSIÓN

La exposición a corto plazo de neuronas *in vitro* ante AP indujo un aumento en la hiperfosforilación de tau, mediada por mecanismos al parecer independientes de GSK3 β ; mientras que la exposición a largo plazo de AP llevó a la hiperfosforilación de tau asociado con un aumento en la actividad de GSK3 β . Por otra parte en ambos casos la exposición al AP produjo un incremento tanto en la acetilación como en la fosforilación de tau. Por lo anterior, podemos concluir que el AP genera efectos post-traduccionales en tau y modifica a la alza la actividad de la cinasa GSK3 β y posiblemente otras cinasas cuyo mecanismo de activación será interesante de evaluar en el futuro para entender mejor los cambios que inducen las dietas altas en grasa y los cambios bioquímicos de tau.

13. REFERENCIAS

- Alavi, S., & Soussi-Yanicostas, N. (2015). Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/151979>
- Andreadis, A., Brown, W., Kosik, K. (1992). Structure and Novel Exons of the Human Tau Gene. *Biochemistry*, 31, 10626–10633.
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126, 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Aubry, S., Shin, W., Crary, J. F., Lefort, R., & Qureshi, Y. H. (2015). Assembly and Interrogation of Alzheimer ' s Disease Genetic Networks Reveal Novel Regulators of Progression. *PLoS ONE*, 10(13), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120352>
- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹¹These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95–130. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(00)00019-9)
- Burns, A., & Iliffe, S. (2009). Alzheimer's disease. *BMJ*, 338(February), 467–471. <https://doi.org/10.1136/bmj.b158>
- Calvo-Ochoa, E., & Arias, C. (2015). Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's Disease studies in animal models. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 31, 1–13. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2531>
- Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., & Arias, C. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(February), 1001–1008. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>
- Calvo-Ochoa, E., Sánchez-Alegría, K., Gómez-Inclán, C., Ferrera, P., & Arias, C. (2017). Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochemistry International*, 110, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in Physiology*, 8(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Chamcheu, Roy, Uddin, Banang-Mbeumi, Chamcheu, Walker, ... Huang. (2019). Role

- and Therapeutic Targeting of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Skin Cancer: A Review of Current Status and Future Trends on Natural and Synthetic Agents Therapy. *Cells*, 8(8), 803. <https://doi.org/10.3390/cells8080803>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M., Rehman, M., Walther, T., ... Mann, M. (2009). Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-regulates Major Cellular Functions. *Science*, 325(834), 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Cole, A. R. (2012). GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00004>
- Dasuri, K., Zhang, L., Kim, S., Bruce-Keller, A., Keller, J. (2016). Dietary and donepezil modulation of mTOR signaling and neuroinflammation in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1862(2), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.11.002>
- Dixit, R., Ross, J., Goldman, Y., & Holzbaur, E. (2008). Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science*, 319(February), 8–11. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1152993>
- Dowling, R., Topisirovic, I., Fonseca, B., & Sonenberg, N. (2010). Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.001>
- Feijoo, C., Campbell, D., Jakes, R., Goedert, M., & Cuenda, A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38 δ at Thr50 promotes microtubule assembly. *Journal of Cell Science*, 118, 397–408. <https://doi.org/10.1242/jcs.01655>
- Ferri, C., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... Scazufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112–2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0)
- Flores-León, M., Pérez-Domínguez, M., González-Barríos, R., & Arias, C. (2019). Palmitic Acid-Induced NAD⁺ Depletion is Associated with the Reduced Function of SIRT1 and Increased Expression of BACE1 in Hippocampal Neurons. *Neurochemical Research*, 1. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02810-8>
- Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2017). Propagation of Tau aggregates Tim Bliss. *Molecular Brain*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7>
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Lawrence, R. C., Wrihten, S. A., Green, A. J., Wilson, S. P., ... Reagan, L. P. (2015). Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes*, 64(11), 3927–3936. <https://doi.org/10.2337/db15-0596>
- Imai, S., Guarente, L. (2014). *NAD⁺ and sirtuins in Aging and Disease*. 24(8), 464–

471. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.002>.NAD

- Ittner, L., Ke, Y., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., ... Götz, J. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*, 142(3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>
- Jean, D. C., & Baas, P. W. (2013). It cuts two ways: Microtubule loss during Alzheimer disease. *EMBO Journal*, 32(22), 2900–2902. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.219>
- Kimura, T., Whitcomb, D., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., ... Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633), 1–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>
- Konzack, S., Thies, E., Marx, A., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2007). Swimming against the Tide: Mobility of the Microtubule-Associated Protein Tau in Neurons. *Neurobiology of Disease*, 27(37), 9916–9927. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0927-07.2007>
- Kuret, J., Chirita, C. N., Congdon, E. E., Kannanayakal, T., Li, G., Necula, M., ... Zhong, Q. (2005). Pathways of tau fibrillization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.016>
- Laurent, C., Buée, L., & Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomedical Journal*, 41(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.01.003>
- Leugers, C., Koh, J. Y., Hong, W., & Lee, G. (2013). Tau in MAPK Activation. *Frontiers in Neurology*, 4(October), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00161>
- Liu, C., & Götz, J. (2013). Profiling Murine Tau with ON , 1N and 2N Isoform-Specific Antibodies in Brain and Peripheral Organs Reveals Distinct Subcellular Localization , with the 1N Isoform Being Enriched in the Nucleus. *PLoS ONE*, 8(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>
- Liu, F., Grundke-iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1 , PP2A , PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. 22, 1942–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x>
- Lucke-Wold, B., Seidel, K., Udo, R., Omalu, B., Ornstein, M., Nolan, R., ... Ross, J. (2017). Role of Tau Acetylation in Alzheimer's Disease and Chronic Traumatic Encephalopathy: The Way Forward for Successful Treatment. *Journal of Neurology and Neurosurgery*, 4(2). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29276758><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5738035>

- Maeda, S., & Mucke, L. (2016). Previews Tau Phosphorylation – Much More than a Biomarker. *Neuron*, 92(2), 265–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.011>
- Mahady, L., Nadeem, M., Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Perez, S. E., & Mufson, E. J. (2018). Frontal Cortex Epigenetic Dysregulation during the Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(1), 115–131. <https://doi.org/10.3233/JAD-171032>
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., ... Blum, D. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), 2257–2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C., Magnaudeix, A., Perrin, M., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 289–309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>
- Martin, Ludovic, Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M., & Terro, F. (2013). Tau protein phosphatases in Alzheimer ' s disease : The leading role of PP2A. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.008>
- Min, S.-W., Sohn, P. D., Li, Y., Devidze, N., Johnson, J. R., Krogan, N. J., ... Gan, L. (2018). SIRT1 Deacetylates Tau and Reduces Pathogenic Tau Spread in a Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*, 38(15), 3680–3688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2369-17.2018>
- Min, S., Chen, X., Tracy, T. E., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., ... Gan, L. (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nature Medicine*, 21(10), 1154–1162. <https://doi.org/10.1038/nm.3951>
- Min, S. W., Chen, X., Tracy, T. E., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., ... Gan, L. (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nature Medicine*, 21(10), 1154–1162. <https://doi.org/10.1038/nm.3951>
- Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., ... Gan, L. (2010). Erratum to Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron*, 68(4), 801. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.013>
- Mukrasch, M., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., ... Zweckstetter, M. (2009). Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. *PLoS Biology*, 7(2), 399–414. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
- Nelson, D., Cox, M. (2017). *Lehninger: Principles of Biochemistry* (McMillan L). New York.
- Olivares, J., & Arellano, A. (2008). Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *Revista Educativa de Bioquímica*, 27(1), 9–18.

- Park, S., Lee, J.-H., Jeon, J.-H., & Lee, M.-J. (2018). Degradation or aggregation: The ramifications of post-translational modifications on tau. *BMB Reports*, 51(6), 265–273. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.6.077>
- Pasantes, H., Arias, C., Massieu, L., Zentella, A., Tapia, R. (1999). *Enfermedades neurodegenerativas Mecanismos celulares y moleculares*. México, D.F.: Fondo de Cultura Exonómica.
- Patel, P., & Woodgett, J. R. (2017). Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 123). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.011>
- Patil, S., & Chan, C. (2005). Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 384(3), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.05.003>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A.-S., McNamara, J., & Williams, M. (2007). *Neurociencia* (3a.). México: Editorial Médica Panamericana.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Rockenfeller, P., & Gourlay, C. W. (2018). Lipotoxicity in yeast: A focus on plasma membrane signalling and membrane contact sites. *FEMS Yeast Research*, 18(4), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy034>
- Salcedo-Tello, P., Hernández-Ortega, K., & Arias, C. (2014). Susceptibility to GSK3 β -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition. *Journal of Alzheimer's Disease*, 39(4), 775–785. <https://doi.org/10.3233/JAD-130749>
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., & Arias, C. (2011). GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.4061/2011/189728>
- Saxton, R., Sabatini, D. (2017). *mTOR Signaling in Growth, Metabolism and Disease.pdf*. 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schönfeld, P., & Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? - Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. 33(10), 1493–1499. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
- Stoothoff, W., Jones, P., Spires-Jones, T., Joyner, D., Chhabra, E., Bercury, K., ... Hyman, B. (2009). Differential effect of three-repeat and four-repeat tau on mitochondrial axonal transport. *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 417–427. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06316.x>

- Takuma, H., Arawaka, S., & Mori, H. (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Developmental Brain Research*, 142(2), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00056-7)
- Trzeciakiewicz, H., Tseng, J., Wander, C. M., Madden, V., Tripathy, A., Yuan, C., & Cohen, T. J. (2017). OPEN A Dual Pathogenic Mechanism Links Tau Acetylation to Sporadic Tauopathy. *Nature Publishing Group*, (February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep44102>
- Uniprot. (2019). Retrieved from <https://www.uniprot.org>
- Various. (2019). Diabetes mellitus A risk factor for Alzheimer's Disease. In T. Nakabeppu, Y., Ninomiya (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <https://doi.org/doi.org/10.1007/978-981-13-3540-2>
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., ... Galas, M. C. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>
- Virkamäki, A., Ueki, K., & Kahn, C. (1999). Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance.pdf. *Journal of Clinical Investigation*, 103(7), 931–943. <https://doi.org/10.1172/JCI6609>
- Williams, W., Chang, M., Hayakawa, T., Grange, E., & Rapoport, S. (1997). In Vivo Incorporation from Plasma of Radiolabeled Palmitate and Arachidonate into Rat Brain Microvessels. *Microvascular Research*, 53, 163–166. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.1984>
- Xia, D., Li, C., & Götz, J. (2015). Biochimica et Biophysica Acta Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 913–924. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.017>
- Yang, X.-J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain : a new partnership for signaling. *BioEssays*, 26, 1076–1087. <https://doi.org/10.1002/bies.20104>
- Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), 873–891. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6359-9>
- Zoncu, R., Sabatini, D., Efeyan, A. (2012). *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. 12(1), 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025.mTOR>

14. ANEXOS

14.1 SOLUCIONES UTILIZADAS

Buffer de lisis (50mL).

40.5 mL de H₂O milli Q.
2.5 mL de solución stock tris (50mM pH 8.8)
175 mg NaCl (60mm)
5mg SDS (0.1%)
25mg DOC (0.5%)
5ml NP-40 10% (1%)
2ml stock 25x complete

TBS 10X (1L)

24.2 g Tris base
80.15 g NaCl
Aforar a 1L con H₂O bidestilada.

TBS 1X

1 parte de TBS 10% diluirla en 9 partes de H₂O bidestilada.

TBS-T (1X-0.1% Tween 20) (1L).

100 mL TBS 10X
Aforar a 1L con H₂O bidestilada.
1mL de tween 20.

Phosphate buffered saline solution (PBS 1X)

NaCl 8g (137mM)
KCl 0.2g (2.7mM)
Na₂HPO₄ 1.44 (10mM)
KH₂PO₄ 0.24g (1.8mM)

PBS 1X BSA 10%

10mL de PBS 1X
1g BSA
Filtrar en campana para esterilizar.

Solución APS (10%).

1g de Persulfato de Amonio por cada 10 mL de H₂O bidestilada.

Buffer de electroforesis 10X (1L)

Tris Base (25mM) 29 g
Glicina (192mM) 144 g
SDS 10% 10 g
Ajustar pH 8.3

Buffer de Transferencia Húmeda (3L)

Tris Base (25mM) 9.08 g
Glicina (192mM) 43.24 g
Metanol (20%) 600 mL
H₂O cbp

Stock Acrilamida-Bisacrilamida (100mL)

Acrilamida 29.2 g
Bis-acrilamida 0.8 g

Soluciones TRIS para acrilamida**TRIS 1.5M SDS 0.4% (150 mL)**

Tris 27.24 g
SDS 0.6 g
H₂O 150 mL
Ajustar pH a 8.8

TRIS 0.5M SDS 0.4% (100 mL)

Tris 6.05 g
SDS 0.4 g

Sodium Phosphate Buffer PB 0.1M

NaH₂PO₄*H₂O 3.1 g
NaHPO₄ 10.9 g

Solución Stock de Ácido Palmítico (200 mM)

12.82 mg de Ácido Palmítico
250 µL de etanol abs.

Nota: Las figuras 1, 2, 6, 7, 8, 9 y 20 se elaboraron con ayuda de la página BioRender.com