



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN *NLRP1b1* EN EL PROCESO
INFLAMATORIO ASOCIADO A OBESIDAD Y PRE-DIABETES EN UN
MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. en C. JONATHAN SALAZAR LEÓN

TUTOR

DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA/UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR/UNAM
DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA
FACULTAD DE MEDICINA/UAEM

CUERNAVACA, MORELOS. MÉXICO.

OCTUBRE 2021.



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.

Este trabajo fue realizado en el **“Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM, en el laboratorio del Consorcio de Neuroinmunobiología a cargo de la Dra. Leonor Pérez Martínez y del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva”**.

El Comité Tutor que evaluó los avances del presente proyecto de investigación se compuso por los Dres. Marcia Hiriart Urdanivia del Instituto de Fisiología Celular/UNAM y Fernando Roger Esquivel Guadarrama de la Facultad de Medicina/UAEM.

El Jurado de la réplica oral de este trabajo de investigación se compuso por los Dres. Lorena Orozco Orozco del INMEGEN, Martín Gustavo Pedraza Alva del IBt/UNAM, Rosa María Uribe Villegas de IBt/UNAM, Claudia González Espinoza del IBB y Juan Miranda Ríos del IBB.

El estudiante Jonathan Salazar León inscrito en el Posgrado de Doctorado Ciencias Biomédicas (PDCB) de la UNAM generación 2015-1, recibió una beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 244063). El proyecto fue financiado gracias al Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA)-UNAM, IN209513 y IN212316.

Del presente proyecto se obtuvo un artículo publicado en la revista Scientific Reports titulado “Nlrp1b1 negatively modulates obesity-induced inflammation by promoting IL-18 production”. Además, el resumen del proyecto se publicó en la revista Frontiers Immunology. Este trabajo se presentó en el XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología, en el XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Inmunología 2018 y en el XXVII Congreso Internacional de Inmunología en China 2019.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, quisiera agradecer al Dr. Gustavo Pedraza por permitirme realizar este proyecto de doctorado bajo su tutoría, asesorándome durante toda mi estancia y otorgándome todas las facilidades en cuanto a materiales, reactivos y su valioso tiempo.

De igual forma, agradezco a la Dra. Leonor Pérez su paciencia y asesoramiento. Y que, entre ambos como jefes de grupo del “Consortio de Neuroinmunobiología (NIB)” me dieron la oportunidad de crecer no solo académicamente y en mi formación como científico, sino que también me ayudaron a crecer en lo personal, además de creer en mi trabajo y en mi. **¡Por todo su apoyo y aportaciones, muchas gracias!**

Agradezco el apoyo del posgrado en Ciencias Biomédicas para poder participar en congresos y cursos que ayudaron a mi formación académica. Al IBt/UNAM y su personal: M.V.z. María Elena Elizabeth Mata Moreno y M.V.z. Graciela Margarita Cabeza Pérez de la unidad de bioterio, a la Q.F.B Xóchitl Alvarado de la Unidad de Microscopía, a Carmelita por mantener listo el material del lab, y a tantos otros, por haberme ayudado con múltiples actividades académicas que acrecentaron mi proyecto. También agradezco a mi Comité Asesor y Jurado por sus aportaciones que enriquecieron mi proyecto y este manuscrito.

A todas, todos y todes del laboratorio del NIB, que me apoyaron de forma directa e indirecta, por sus observaciones, su tiempo y su entusiasmo por la ciencia. En especial a Edgardo, Karla, Carlos, Elisa, Luis, Sol, Eladio, Angélica, Jorge, Martha, Tomás, Laura, Oswaldo y Cesar†, por hacer de las horas mas frustrantes las mas llevaderas, llenas de alegría y las más recordadas.

A toda mi familia. A mis padres: Alicia y Raúl; y suegros: Leticia y Humberto, porque siempre conté con su incondicional sostén en toda mi vida académica. Mis hermanos; Rigel, Arnold y Humberto por su apoyo. Mis otros hermanos, aunque no sean de sangre; Juan José y Enrique por alentarme desde siempre y no darse por vencidos.

A mi flamante esposa Violeta, por su paciencia, entrega, consejos, tiempo, por estar siempre a mi lado y por soportarme. Por hacer de este viaje terrenal una gran aventura, sé que contigo a mi lado todo tiene mas sentido. **¡Te agradezco todo y te amo!**

A todos los que de alguna forma me apoyaron en mi realización hacia una vida académica científica. Pero, sobre todo a los tantos ratones y ratonas que dieron su vida para que este proyecto cobrara sentido. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible.

Agradezco a mi poder superior por todos los obstáculos y retos en mi vida, ya que por todos ellos he logrado y crecido tanto.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 5 |
| TABLA DE ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| LA OBESIDAD EN EL MUNDO Y EN MÉXICO..... | 11 |
| LAS COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD..... | 11 |
| MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA..... | 15 |
| EFECTOS METABÓLICOS DE LA INSULINA EN EL ORGANISMO..... | 17 |
| CONTROL DEL CONSUMO Y GASTO ENERGÉTICO; EL HIPOTÁLAMO COMO REGULADOR CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA..... | 21 |
| ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO INFLAMATORIO EN EL EJE HIPOTÁLAMO-ÓRGANOS METABÓLICOS... .. | 22 |
| DESARROLLO DEL PROCESO INFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO..... | 25 |
| ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO INFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO, LA METAINFLAMACIÓN. | 26 |
| EL PAPEL DE ALGUNOS COMPONENTES INFLAMATORIOS Y ESTRUCTURAS EN LA METAINFLAMACIÓN.. | 26 |
| EL MECANISMO MOLECULAR DE LA FISIOPATOLOGÍA OCASIONADA POR LA OBESIDAD. | 29 |
| EL PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA OCASIONADA POR LA OBESIDAD..... | 29 |
| OTROS METABOLITOS INDUCIDOS EN LA OBESIDAD CONTRIBUYEN A LA FISIOPATOLOGÍA. | 31 |
| LOS NLRs SENSORES GUARDIANES DE LA HOMEOSTASIS..... | 34 |
| EL INFLAMASOMA NLRP3: CRUCIAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL PROCESO INFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO INDUCIDO POR LA OBESIDAD. | 35 |
| LAS DIFERENCIAS METABÓLICAS ENTRE C57BL/6J Y BALB/C; EL PAPEL DEL LOS INFLAMASOMAS. | 39 |
| EL INFLAMASOMA NLRP1 COMO SENSOR METABÓLICO | 40 |
| EL PAPEL ANTAGÓNICO DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-1 β E IL-18 EN DESÓRDENES METABÓLICOS. | 43 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 46 |
| HIPÓTESIS | 47 |
| OBJETIVO GENERAL | 47 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 47 |
| RESULTADOS | 48 |
| NLRP1B1 SE EXPRESA CORRECTAMENTE Y ES FUNCIONAL EN RATONES C57BL/6J ^{Tg} | 48 |
| RATONES C57BL/6J ^{Tg} NO MUESTRA ALTERACIONES EN EL METABOLISMO BASAL DE CARBOHIDRATOS. | 52 |
| NLRP1B1 NO AFECTA EL CONSUMO CALÓRICO NI PREVIENE LA OBESIDAD RESULTANTE DEL CONSUMO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA EN RATONES C57BL/6J ^{Tg} | 54 |
| NLRP1B1 ATENUA LA INTOLERANCIA A GLUCOSA Y RESISTENCIA A INSULINA EN RATONES C57BL/6J ^{Tg} OBESOS. | 57 |
| NLRP1B1 MODULA LA SECRECIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES C57BL/6J ^{Tg} OBESOS. | 60 |
| NLRP1B1 AUMENTA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES C57BL/6J ^{Tg} OBESOS. | 63 |
| LOS RATONES C57BL/6J ^{Tg} OBESOS NO SON RESISTENTES A LEPTINA..... | 65 |
| NLRP1B1 DISMINUYE EL PROCESO INFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO DE ANIMALES OBESOS..... | 68 |
| NLRP1B1 REGULA EL PERFIL PROINFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO DE ANIMALES OBESOS. | 72 |

| | |
|---|------------|
| NLRP1B1 ATENUA EL PROCESAMIENTO DE CASP-1 E IL-1 β | 74 |
| RATONES C57BL/6J ^{Tg} OBESOS MODULAN LA DISLIPIDEMIA INDUCIDO POR LA DAG | 77 |
| EL ALELO NLRP1B1 PROMUEVE LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO EN OBESOS A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE LA IL-18. | 79 |
| LOS EFECTOS DE NLRP1B1 SOBRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS NO SON MEDIADOS POR CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE..... | 82 |
| VARIANTES DE NUCLEÓTIDOS ÚNICOS EN EL GENE NLRP1 HUMANO ASOCIADOS AL METABOLISMO DE LÍPIDOS. | 86 |
| DISCUSIÓN | 89 |
| RATONES C57BL/6J ^{Tg} MUESTRAN UNA MEJOR TOLERANCIA Y SENSIBILIDAD A INSULINA A TRAVÉS DE MANTENER NIVELES BAJOS DE INSULINA Y LEPTINA..... | 89 |
| RATONES C57BL/6J ^{Tg} MANTIENEN UN PERFIL ANTIINFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO A TRAVÉS DE LA DISMINUCIÓN DEL PROCESAMIENTO DE CASP-1 E IL-1 β | 91 |
| RATONES C57BL/6J ^{Tg} MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN EN EL PERFIL LIPÍDICO, A PESAR DE PRESENTAR MAYOR LIPOLISIS DEBIDA A UN MAYOR PROCESAMIENTO DE LA IL-18 EN SU TEJIDO ADIPOSO..... | 95 |
| LA EXPRESIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP1 EN CÉLULAS MIELOIDES NO IMPIDIÓ LAS ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. | 96 |
| SNPs EN EL GEN NLRP1 PUDIERA TENER UNA PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE ALTERACIONES METABÓLICAS EN HUMANOS. | 97 |
| PUNTOS PARA DESTACAR EN ESTA TESIS Y PERSPECTIVAS..... | 98 |
| METODOLOGÍA | 101 |
| ANIMALES..... | 101 |
| GENOTIPIFICACIÓN | 101 |
| ANÁLISIS METABÓLICO | 102 |
| ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO | 102 |
| ELISAS | 103 |
| ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS..... | 103 |
| PIROPTOSIS | 104 |
| CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE PRE ADIPOCITOS 3T3-L1..... | 104 |
| TRASPLANTE DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA | 104 |
| PREPARACIÓN DE TEJIDOS | 105 |
| ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO ADIPOSO Y HEPÁTICO | 105 |
| INMUNOFLUORESCENCIA | 106 |
| EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES E INMUNOTRANSFERENCIA | 106 |
| PERFIL INFLAMATORIO DEL TEJIDO ADIPOSO..... | 107 |
| ANTICUERPOS | 107 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 108 |
| REFERENCIAS | 109 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. COMORBILIDADES Y ENFERMEDADES METABÓLICAS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD..... | 14 |
| FIGURA 2. LIBERACIÓN DE LA INSULINA POR CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS..... | 19 |
| FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA. | 20 |
| FIGURA 4. CIRCUITO HAMBRE-SACIEDAD Y REGULACIÓN ENERGÉTICA..... | 23 |
| FIGURA 5. COMUNICACIÓN ENTRE ADIPOCINAS CON ÓRGANOS METABÓLICAMENTE ACTIVOS..... | 24 |
| FIGURA 6. COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS INMUNES Y ÓRGANOS METABÓLICAMENTE ACTIVOS..... | 28 |
| FIGURA 7. LA ACTIVACIÓN DE CINASAS DE SER/THR POR DISTINTAS SEÑALES PROVOCA LA FOSFORILACIÓN INHIBIDORA DE NODOS ESPECÍFICOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA. | 33 |
| FIGURA 8. MIEMBROS Y ESTRUCTURAS DE LA FAMILIA DE SENSORES TIPO NLRs..... | 37 |
| FIGURA 9. ACTIVACIÓN DE NLRPS EN TEJIDO ADIPOSO EN RESPUESTA AL CONSUMO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA. | 38 |
| FIGURA 10. ALELOS NLRP1 Y SU EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN DIVERSAS CEPAS DE RATONES..... | 42 |
| FIGURA 11. LA EXPRESIÓN DE NLRP1B1 CONFIERE SUSCEPTIBILIDAD A LA CEPA C57BL/6J. | 50 |
| FIGURA 12. DOSIS GÉNICA Y FUNCIONALIDAD DEL NLRP1B1 ENTRE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS Y BALB/C. | 51 |
| FIGURA 13. LA EXPRESIÓN DE NLRP1B1 NO ALTERA EL METABOLISMO DE GLUCOSA EN RATONES C57BL/6J ^{TG} | 53 |
| FIGURA 14. EL GEN NLRP1B1 NO AFECTA LA GANANCIA DE PESO NI LA INGESTA DE ALIMENTO NORMAL O ALTA EN GRASA..... | 56 |
| FIGURA 15. EL GEN NLRP1B1 REGULA EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS POSTERIOR A 3 MESES CON UNA DAG. | 59 |
| FIGURA 16. CUANTIFICACIÓN GLOBAL DE LA RESPUESTA METABÓLICA PRODUCIDA POR UNA DIETA DAG. | 59 |
| FIGURA 17. EL GEN NLRP1B1 REGULA LA SECRECIÓN DE INSULINA POSTERIOR A 3 MESES CON UNA DAG. | 62 |
| FIGURA 18. LA PRESENCIA DE NLRP1B1 MEJORA LA SENSIBILIDAD A INSULINA EN RATONES C57BL/6J OBESOS. | 64 |
| FIGURA 19. RATONES C57BL/6J OBESOS MAS SENSIBLES A LEPTINA. | 67 |
| FIGURA 20. LA EXPRESIÓN DEL ALELO NLRP1B1 DISMINUYE EL INFILTRADO DE CÉLULAS INMUNES EN TEJIDO ADIPOSO RETROPERITONEAL DE RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS..... | 71 |
| FIGURA 21. LA EXPRESIÓN DEL ALELO NLRP1B1 DISMINUYE EL NUMERO DE CÉLULAS INMUNES EN TEJIDO ADIPOSO RETROPERITONEAL DE RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS. | 71 |
| FIGURA 22. NLRP1B1 ATENÚA LAS CÉLULAS PROINFLAMATORIAS EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS. | 73 |
| FIGURA 23. NLRP1B1 DISMINUYE EL PROCESO INFLAMATORIO EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS. | 73 |
| FIGURA 24. NLRP1B1 DISMINUYE LA INFLAMACIÓN EN EL TEJIDO ADIPOSO EN RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS. | 76 |
| FIGURA 25. NLRP1B1 NO AFECTA LA ACTIVACIÓN DE IL-1 β INDUCIDO POR ESTÍMULOS DE ESTRÉS METABÓLICO..... | 76 |
| FIGURA 26. NLRP1B1 MEJORA EL PERFIL LÍPIDOS EN RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS..... | 78 |
| FIGURA 27. NLRP1B1 REDUCEN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS. | 78 |
| FIGURA 28. NLRP1B1 PROMUEVE LA PRODUCCIÓN DE IL-18 EN RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS..... | 80 |
| FIGURA 29. IL-18 PROMUEVE LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATONES C57BL/6J ^{TG} OBESOS..... | 80 |
| FIGURA 30. LA IL-18 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE HSL EN CÉLULAS 3T3-L1. | 81 |
| FIGURA 31. PARÁMETROS BASALES POST RADIACIÓN EN RATONES C57BL/6J Y C57BL/6J ^{TG} ALIMENTADOS CON DN..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 32. EL TRASPLANTE DE CMO NO AFECTAN LA GANANCIA DE PESO, NI EL CONSUMO LUEGO DE 10 SEMANAS CON DAG..... | 84 |
| FIGURA 33. EL TRASPLANTE DE CMO NO REGULAN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS LUEGO DE 10 SEMANAS CON DAG..... | 85 |
| FIGURA 34. LA EXPRESIÓN DE <i>NLRP1B1</i> EN EL COMPARTIMENTO HEMATOPOYÉTICO NO TIENE UN EFECTO SOBRE LOS ÓRGANOS..... | 85 |
| FIGURA 35. ANÁLISIS DEL SNP rs884367 E IL-18 EN UNA POBLACIÓN MEXICANA..... | 88 |
| FIGURA 36. FENOTIPO DEL RATÓN TRANSGÉNICO OBESO METABÓLICAMENTE SANO..... | 100 |
| TABLA 1. INFORMACIÓN SOBRE EL EFECTO DE LA IL-1 β EN EL METABOLISMO..... | 43 |
| TABLA 2. INFORMACIÓN SOBRE EL EFECTO DE LA IL-18 EN EL METABOLISMO..... | 44 |
| TABLA 3. INFORMACIÓN NUTRIMENTAL Y CONTENIDO ENERGÉTICO DE LA DIETA NORMAL Y DIETA ALTA EN GRASA..... | 54 |
| TABLA 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS..... | 87 |

TABLA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| 3T3-L1 | Línea celular derivadas de fibroblastos |
| ABC | Área bajo la curva |
| AgRP | Péptido relacionado con agouti (siglas en inglés) |
| AMPK | Cinasa activada por monofosfato de adenina (siglas en inglés) |
| aMSH | Péptido estimulante de los melanocitos (siglas en inglés) |
| ARC | Núcleo arquato (siglas en inglés) |
| AS160 | Sustrato de Akt |
| ASC | Proteína asociada a apoptosis (siglas en inglés) |
| BA | Adipocitos pardos (siglas en inglés) |
| Balb/c | Cepa de ratón albino |
| BAT | Tejido adiposo pardo (siglas en inglés) |
| C57BL/6J | Cepa de ratón negro endogámica |
| C57BL/6J ^{Tg} | Cepa de ratón negro endogámica transgénico |
| Ca | Calcio |
| CARD | Dominio de reclutamiento y activación de la Casp-1 (siglas en inglés) |
| CART | Péptido relacionado a la cocaína y anfetamina (siglas en inglés) |
| Casp1-9 | Caspasas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 |
| CCL | Ligando de quimiocinas (siglas en inglés) |
| CLS | Estructuras tipo corona (siglas en inglés) |
| CMO | Células de medula ósea |
| DAG | Dieta alta en grasa |
| DAMP | Patrones moleculares asociados a daño (siglas en inglés) |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DN | Dieta normal |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés) |
| ECV | Enfermedades cardiovasculares |
| eIF | Factor de iniciación de la traducción (siglas en inglés) |
| ENSANUT | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de México |
| ER | Retículo endoplasmático (siglas en inglés) |
| Erk | Proteína cinasas activadas por mitógenos (siglas en inglés) |
| FIND | Dominio con actividad por conocer (siglas en inglés) |
| FOXO | Familia de factores de transcripción (siglas en inglés) |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (siglas en inglés) |
| GHSR | Receptor de secretagogo de la hormona del crecimiento (siglas en inglés) |
| GLUT1-4 | Transportador de glucosa (siglas en inglés) |
| GSK3 | Glucógeno sintasa quinasa 3 (siglas en inglés) |
| GTT | Prueba de tolerancia a glucosa (siglas en inglés) |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad (siglas en inglés) |
| HI | Hiperinsulinemia |
| HOMA-IR | Modelo de Evaluación de la Homeostasis para resistencia a insulina |
| HSL | Lipasa sensible a hormonas (siglas en inglés) |
| IL1/4/6/10/18 | Interleucinas 1/4/6/10/18 |
| ILK | Cinasa ligada a la integrina rapamicina (siglas en inglés) |
| IMC | Índice de masa corporal |
| INF | Interferón |
| INMEGEN | Instituto Nacional de Medicina Genómica |
| IP | Vía intraperitoneal |
| IP | Yoduro de propidio (siglas en inglés) |
| IR | Receptor de insulina (siglas en inglés) |
| IRS 1/2 | Sustrato del receptor de insulina (siglas en inglés) |
| ITT | Prueba de resistencia a insulina (siglas en inglés) |
| JNK | Cinasas c-Jun N-terminal (siglas en inglés) |
| LAMP | Patrones moleculares asociados al estilo de vida (siglas en inglés) |
| LDH | Enzima lactato deshidrogenasa (siglas en inglés) |
| LRR | Dominio rico en repeticiones de leucina (siglas en inglés) |
| LTx | Toxina letal del ántrax (siglas en inglés) |

| | |
|-----------|---|
| Ly6G | Complejo de antígeno linfocitario 6, locus G (siglas en inglés) |
| M1 | Estado proinflamatorio |
| M2 | Estado antiinflamatorio |
| MAPK | Cinasas activadas por mitógenos (siglas en inglés) |
| MCP | Proteína quimioatrayente de monocitos (siglas en inglés) |
| MIP | Proteína inflamatorio de macrófagos (siglas en inglés) |
| mRNA | RNA Ácido ribonucleico mensajero (siglas en inglés) |
| mTORc1/2 | Blanco mamífero del complejo 1/2 de rapamicina (siglas en inglés) |
| N12/13 | Líneas de ratones transgénicos Nlrp1b1 |
| NACHT | Dominio central de unión a nucleótidos (siglas en inglés) |
| NF-κB | Factor nuclear Kappa Beta (siglas en inglés) |
| Nlrp1/3 | Inflamasoma receptor tipo NOD 1 y 3 en ratón (siglas en inglés) |
| NLRP1 | Inflamasoma receptor tipo NOD 1 en humano (siglas en inglés) |
| Nnt | Gen enzima antioxidante mitocondrial (siglas en inglés) |
| NOD | Dominio de oligomerización a nucleótidos (siglas en inglés) |
| NPY | Neuropéptido Y (siglas en inglés) |
| OCDE | Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico |
| PAMP | Patrones moleculares asociados a patógenos (siglas en inglés) |
| PCR | Reacción en cadena de la Polimerasa (siglas en inglés) |
| PDK1 | Quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (siglas en inglés) |
| PERK | Cinasa del retículo endoplásmico (siglas en inglés) |
| PFA | Paraformaldehído |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinasa (siglas en inglés) |
| PKB/Akt | Proteína quinasa B (siglas en inglés) |
| PKC | Proteína cinasa 3 |
| POMC | Pro-opiomelanocortina |
| PTB | Dominio de unión a fosfotirosina (siglas en inglés) |
| PYD | Domino de pirina, de la molécula adaptadora (siglas en inglés) |
| Rab/GAP | Familia de proteínas GTPasas de la súper familia Ras (siglas en inglés) |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés) |
| RTK | Receptor tirosina quinasa (siglas en inglés) |
| SARS-CoV2 | Síndrome respiratorio agudo grave causado por un coronavirus nuevo |
| Ser | Serina |
| SM | Síndrome metabólico |
| SNP | Polimorfismos de un solo nucleótido nucleótidos únicos (siglas en inglés) |
| SOCS3 | Supresor de la señalización de citocinas 3 (siglas en inglés) |
| TG | Triglicéridos |
| Thr | Treonina |
| TLR | Receptores tipo Toll (siglas en inglés) |
| TNF | Factor de necrosis tumoral (siglas en inglés) |
| Tyr | Tirosina |
| UCI | Unidad de cuidados intensivos |
| VL-LDL | Lipoproteínas de muy baja densidad (siglas en inglés) |
| WAT | Tejido adiposo blanco (siglas en inglés) |
| WB | Western blot |
| WHO | Organización Mundial de la Salud (siglas en inglés) |

RESUMEN

En la actualidad existe un gran número de reportes que demuestran la existencia de un proceso inflamatorio crónico en el tejido adiposo asociado a la obesidad. Las altas cargas lipídicas y glicémicas resultantes del exceso energético, desencadenan la activación del inflamasoma Nlrp3, lo que conlleva al procesamiento de las citocinas IL-1 β e IL-18 y con ello, al establecimiento del proceso inflamatorio que media las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. Estas y otras citocinas inflamatorias inactivan la vía de señalización de la insulina, lo que resulta en la resistencia a insulina y posteriormente en el desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares o algunos tipos de cáncer.

El conocimiento que sustenta la participación del inflamasoma Nlrp3 y del proceso inflamatorio en las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, se ha generado en animales C57BL/6J deficientes tanto del inflamasoma como de sus componentes (Caspasa-1 o Asc). Sin embargo, a diferencia de los ratones C57BL/6J, otras cepas de ratones como Balb/c, fueron menos propensas a desarrollar obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa al ser alimentados con una dieta alta en grasas. Se ha identificado que los ratones C57BL/6J portan el alelo 2 del gen Nlrp1b (Nlrp1b2), mientras que los ratones Balb/c portan el alelo 1 (Nlrp1b1), y que estos inflamasomas pueden ser activados diferencialmente y conferir respuestas biológicas antagónicas. La participación de estos inflamasomas en un contexto metabólico entre estas cepas es desconocida.

En este trabajo, evaluamos los cambios en el metabolismo inducidos por una dieta alta en grasa en animales de la cepa Balb/c (Nlrp1b1), C57BL/6J silvestres (Nlrp1b2) y C57BL/6J^{Tg} (transgénicos que también expresan al alelo Nlrp1b1). Observamos que, aunque los ratones C57BL/6J^{Tg} ganaron el mismo peso que los ratones silvestres al ser alimentados con la dieta obesogénica, el proceso inflamatorio en el tejido adiposo fue menor, además de mostrar un perfil antiinflamatorio. De acuerdo con esto, los ratones C57BL/6J^{Tg} presentaron una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, mientras que sus contrapartes silvestres presentaron intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en respuesta a la dieta obesogénica.

Demostramos que el efecto protector del inflamasoma Nlrp1b1 en los ratones C57BL/6J obesos es mediado por la IL-18. Esto debido a que cuantificamos mayores niveles de esta citocina en el tejido adiposo de los ratones C57BL/6J^{Tg}, así como en ratones Balb/c independientemente de la dieta. Este aumento, indujo un claro aumento de la lipólisis y la disminución en la dislipidemia en ratones C57BL/6J^{Tg} resultante de la dieta obesogénica. De acuerdo con esto, la exposición de adipocitos 3T3-L1 a IL18 *in vitro*, indujo un incremento en la activación de la enzima HSL, clave en la movilización de ácidos grasos en estos adipocitos.

En conjunto, nuestros datos indican que el inflamasoma Nlrp1b1, en respuesta al exceso calórico resultante de la ingesta de una dieta rica en grasas, modula negativamente las alteraciones metabólicas a través de promover la producción de IL18, y atenuar el proceso inflamatorio en el tejido adiposo. Esto pone de manifiesto que la expresión diferencial de variantes alélicas que codifican para componentes del inflamasoma, podrían controlar la susceptibilidad o la resistencia a desarrollar alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad.

Congruente con esta idea, encontramos en una población mexicana mestiza que variantes alélicas del gen NLRP1 humano, se asocian con menores niveles de glucosa en sangre y mayores niveles de HDL, aunque también con un incremento en el nivel de obesidad. Esto sugiere que variantes alélicas de NLRP1 pueden tener un efecto protector y disminuir el riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas.

INTRODUCCIÓN

La obesidad en el mundo y en México.

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa, la cual representa un riesgo para la salud [1]. Respecto a la clasificación mundialmente aceptada, se dice que un individuo con sobrepeso tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor a 25, y con obesidad cuando el IMC es mayor a 30 [2].

De acuerdo con esta clasificación, la prevalencia de la obesidad ha ido aumentando a lo largo del tiempo, sin embargo, se ha conservado constante tanto en mujeres como en hombres a nivel mundial desde los años 90's [3]. Para el año 2005 se reportó una prevalencia del 33% de sobrepeso en la población adulta. En el año 2016, el 39% de los adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y 13% obesidad, y se prevé que de continuar esta tendencia, la prevalencia aumente a 57.8% para el año 2030 en el mundo, por lo que la obesidad es considerada una pandemia [3].

La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), integrada actualmente por 35 países, México incluido, reportó en el 2015 que 1 de cada 2 personas tenía sobrepeso u obesidad, en casi la mitad de los países de la OCDE [4]. En el año 2017, México se colocó como el segundo país con la tasa más alta de obesidad (32.4%) después de Estados Unidos (38.2%), dentro de los países pertenecientes a la OCDE [4-5].

En el 2012, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de México (ENSANUT) registró que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos mexicanos mayores de 20 años era del 71.3%. De éstos el 38.8% correspondió al sobrepeso y el 32.4% a la obesidad [6]. Para el año 2018, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue del 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad), con ello, 7 de cada 10 adultos continúan padeciendo sobrepeso u obesidad [7]. Esto es alarmante dado que el tener una condición de sobrepeso u obesidad, predispone a los individuos al desarrollo de diversas enfermedades como se discutirá a continuación.

Las complicaciones de la obesidad.

Entre los principales factores que llevan al desarrollo de la obesidad, se encuentra la excesiva disponibilidad e ingesta de alimentos, así como una vida sedentaria. Dichos factores, alteran drásticamente el balance energético normal que existe entre la oferta de kilocalorías obtenida de

alimentos, y los requerimientos metabólicos de los organismos; es decir, existe un desequilibrio donde el consumo calórico es mayor que el gasto energético de los individuos [8].

Actualmente, la obesidad es considerada ya una enfermedad, dada la premisa de que una enfermedad es “una condición en la cual se encuentra alterado el funcionamiento normal de un organismo, y esta se manifiesta típicamente al distinguir signos y síntomas”, según el diccionario Merriam-Webster [9].

Acorde con esto, la obesidad representa una enfermedad multifactorial y compleja, además de que por cada incremento de 5 puntos posterior a un IMC normal el cual es de 25 kg/m², aumenta la mortalidad general en un 30%. Dado que la obesidad no es particular de un solo país como ya mencionamos anteriormente, coloca a la obesidad como un grave problema de salud pública a nivel mundial [10].

Las personas que padecen de obesidad presentan un mayor riesgo a desarrollar un gran número de comorbilidades asociadas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares (ECV), falla renal, apnea del sueño, tromboembolismo, e incluso algunos tipos de cáncer [10]. Por lo que no es sorprendente que la prevalencia, por ejemplo de la DM2 sea tan cercana a las tasas de prevalencia de la obesidad [11]. De hecho, muchas de las complicaciones que se presentan en individuos con obesidad se presentan también en personas con alteraciones metabólicas como síndrome metabólico (SM), prediabetes, DM2 y dislipidemias (Figura 1) [12].

De igual forma, se ha asociado a la obesidad con una mayor susceptibilidad y severidad a infecciones. En especial infecciones del tracto respiratorio, infecciones cutáneas y postquirúrgicas, las cuales pueden prolongar la estancia hospitalaria o incrementar el riesgo de mortalidad [13,14,15]. Recientemente, estudios derivados de la pandemia causada por la infección con el SARS-CoV2 (síndrome respiratorio agudo grave causado por un coronavirus nuevo) muestran que la obesidad es un factor importante y de alto riesgo para la hospitalización, el ingreso a la unidad de cuidados intensivos (UCI) y el desarrollo de consecuencias graves que pueden llevar a la muerte, en caso de enfermarse por COVID-19 [16-18].

Las anormalidades metabólicas observadas en un estado de obesidad, suelen considerarse “enfermedades complejas”, ya que los individuos que las presentan manifiestan alteración del metabolismo energético y múltiples perturbaciones en la homeostasis del metabolismo de la glucosa incluyendo: (1) alteraciones en la secreción de insulina por las células pancreáticas; (2) resistencia a la insulina (efecto disminuido de la acción de la insulina al unirse a su receptor) en músculo, hígado, tejido

adiposo e hipotálamo, y, por tanto, (3) anormalidades en la absorción de la glucosa en órganos metabólicamente activos [^{19,20}].

Por lo que el monitoreo de los parámetros antropométricos de las personas (IMC, circunferencia de cintura) y parámetros metabólicos (niveles de glucosa basal, perfil lipídico) es crucial, ya que de esta forma se puede determinar el estado de salud de los individuos y, en caso de ser necesario, sugerir cambios en el estilo de vida [¹³]. Esto es debido a que la existencia de alteraciones en estos parámetros podría ser indicativo del desarrollo de obesidad, que a la larga podría desencadenar en el desarrollo de alteraciones metabólicas como ya se mencionó. Desgraciadamente, este tipo de alteraciones no solo se han limitado a la población adulta, sino que también se han detectado en la población juvenil de forma cada vez más frecuente [^{13,21,22}].

Comorbilidades relacionadas con la obesidad

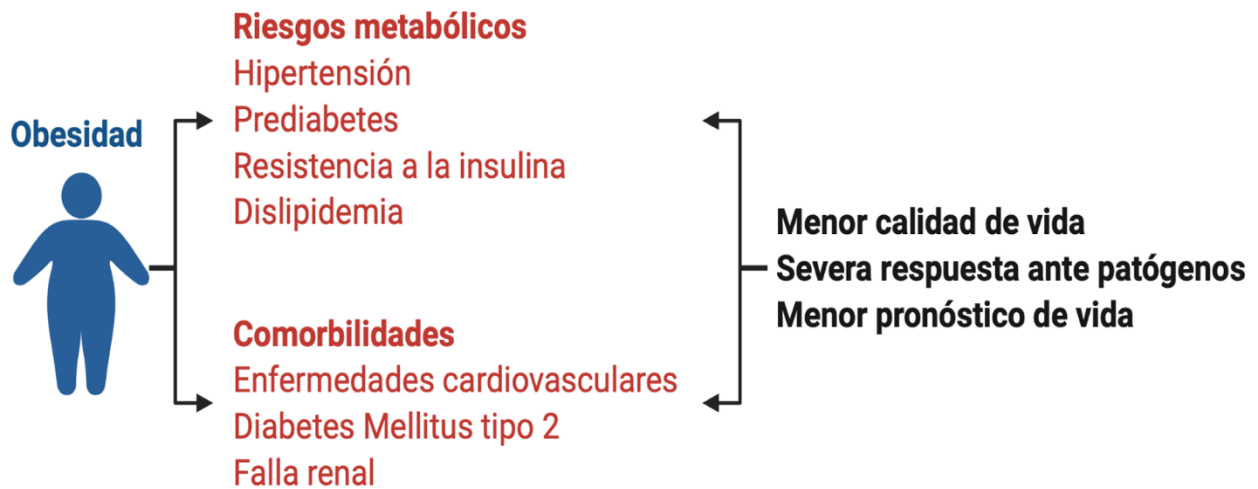


Figura 1. Comorbilidades y enfermedades metabólicas relacionados con la obesidad.

Los individuos con obesidad tienen un alto riesgo a desarrollar enfermedades complejas como pueden ser cáncer y padecimientos cardiovasculares las cuales, de no ser atendidas, terminan en comorbilidades y con ello, disminuyen la calidad de vida de las personas. Es importante mencionar que, aun en ausencia de comorbilidades, el presentar obesidad, predispone a las personas a desarrollar aterosclerosis, disfunción cardíaca, mal pronóstico contra infecciones por patógenos, así como a una respuesta inmune ineficiente.

Mecanismo de acción de la insulina.

Antes de describir la fisiopatología ocasionada por la obesidad, comenzaremos por describir la importancia de los efectos de la insulina en la fisiología normal en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos. En este sentido, se sabe que la insulina es una hormona polipeptídica, la cual es en gran medida responsable de provocar diversos efectos metabólicos en el organismo. Su importancia va de la mano con el de la glucosa, considerada como “la unidad básica de combustible” en nuestros cuerpos.

Si bien se reconoce que la insulina es una hormona producida, y secretada por las células β del páncreas en respuesta al aumento de los niveles de glucosa, aminoácidos, cetoácidos y ácidos grasos en circulación [23]. Hoy en día se sabe que la insulina también se puede sintetizar localmente en la corteza cerebral [24,25]. Esta insulina derivada de neuronas, es capaz de modular rápidamente los mecanismos sinápticos y microcircuitos en el cerebro, lo que sugiere que es capaz de regular la homeostasis energética conforme la demanda de las redes neuronales lo requieran [24]. De hecho, los receptores de insulina y las vías de transducción de señales descritas en tejidos de la periferia, son también similares a la amplia gama de funciones en el sistema nervioso central [26]. Sin embargo, para fines de este trabajo, nos enfocaremos en el efecto de la insulina sobre los tejidos periféricos.

Inmediatamente después de una comida rica en grasas y carbohidratos, el intestino delgado absorbe los carbohidratos de los alimentos digeridos. Con ello, los niveles de glucosa en sangre aumentan (130-180 mg/dL), el cual es un estímulo suficiente para que las células β del páncreas secreten insulina (Figura 2 [23]).

Se han descrito 2 principales vías activadas por la acción de la insulina: 1) la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y 2) la vía de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En la vía MAPK, Erk1/2 tiene una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas que principalmente participan en la regulación de la expresión génica de tejidos sensibles a la insulina, pero no en la regulación del transporte de glucosa [27]. Mientras que en la activación de la vía de la PI3K, Akt también conocida como la proteína cinasa PKB es la principal cinasa por la cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Figura 2) [28].

La insulina inicia sus acciones biológicas tras la unión a su receptor (IR), localizado en la membrana de su célula diana. Dicho receptor es un heterotetrámero compuesto por 4 subunidades; 2 subunidades α y 2 subunidades β unidas por puentes disulfuro. Una vez que la insulina se une a la subunidad α generara un cambio en la conformación de la estructura que activara la función intrínseca cinasa de tirosina (RTK) de la subunidad β , por lo que al ser estimulado por su ligando (insulina) se

autofosforilara en residuos de tirosina (Tyr). Las subunidades fosforiladas permiten el reclutamiento de varias proteínas, dentro de las cuales destaca el llamado sustrato del receptor de insulina (IRS-1), que contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB, Figura 3) [28].

A partir de la fosforilación de IRS-1 la vía puede tomar diversos caminos, sin embargo, para fines del trabajo hablaremos de la vía PI3K. Entonces, la fosforilación en tirosinas de IRS-1 permite reclutar y activar a la PI3K, la cual fosforila al PIP2 en la posición 3 del anillo de inositol para convertirlo en PIP3 en la membrana [29]. Esto sirve de anclaje para la proteína PDK1 y también para la proteína Akt/PKB al fosforilarlas en dos sitios reguladores específicos. La primera fosforilación se lleva a cabo en la treonina 308 (Akt^{Thr308}), y la segunda fosforilación en el dominio C-terminal de la serina 473 (Akt^{Ser473}) [29]. La fosforilación de Akt en la Ser473 también puede ser mediada por otras cinasas como mTORC2 [30], o la cinasa ligada a la integrina (ILK) [31].

De esta forma, Akt/PKB regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta como FOXO; aumento de adipogénesis [32], GSK3; aumento en la síntesis de glucógeno [33] y caspasa 9; disminución de apoptosis [34]. Sin embargo, el transporte de glucosa mediado por la acción de la insulina es promovido por el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4), el cual viaja de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática (Figura 3) [35].

Para que GLUT4 intervenga, es necesaria la participación de la proteína AS160 (contiene un dominio Rab/GAP) [36]. AS160 en su estado no fosforilado se encuentra activa y regula negativamente a proteínas Rab-GTP, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. Pero cuando AS160 es fosforilada por Akt/PKB se inhibe, por lo que se aumenta el tráfico vesicular dependiente de Rab-GTP, e induce que GLUT4 pueda ahora ser transportado a la membrana plasmática [37].

Como resultado, GLUT4 puede introducir glucosa exógena a las células de órganos metabólicamente activos, y ello permite que se cumplan funciones vitales, además de disminuir los niveles de glucosa en sangre (hipoglucemia o “bajo nivel de azúcar”), por lo que se dice que, la insulina es una hormona hipoglucemiante [23,38]. De acuerdo con esto, una vez que los niveles de glucosa caen por debajo del umbral de detección, las células β pancreáticas disminuyen la liberación de la insulina [39].

Efectos metabólicos de la insulina en el organismo.

Los efectos metabólicos de la insulina median una amplia gama de acciones específicas para cada tejido, de igual forma se involucran cambios rápidos en la fosforilación y la función de proteínas, así como cambios en la expresión de genes [40]. En este contexto, la respuesta generada por el efecto de la insulina en el hígado y músculo, tiene como resultado el aumento en la tasa de síntesis del glucógeno (glucogénesis), y posteriormente, este glucógeno almacenado será fuente de energía en reserva. De acuerdo con esto, se inhibe la tasa de glucogenólisis en hígado, es decir, se evita el proceso catabólico que hace referencia a la degradación del glucógeno a glucosa para que sea liberada al torrente [41].

Con respecto al tejido adiposo, sabemos que es el principal órgano de almacenamiento de energía, y esto se ve reflejado en su capacidad de guardar lípidos. A través de la alimentación, la insulina estimula la síntesis de lípidos y adipogénesis, por lo que la síntesis y el almacenamiento de triglicéridos (TG) en el tejido adiposo es crucial y estrictamente regulado, sin embargo, este proceso también es llevado a cabo en el hígado, músculo, corazón y páncreas [42].

La glucosa es también un sustrato para la síntesis de novo de ácidos grasos, por lo que, en respuesta al incremento en los niveles de glucosa, la insulina estimula su absorción en los adipocitos (unidad celular que forma al tejido adiposo), y activa las enzimas glucolíticas y lipogénicas [43]. De acuerdo con esto, se inhibe la lipólisis y la degradación de proteínas en el tejido adiposo [39]. Por otro lado, a pesar de que la lipólisis se produce principalmente en el tejido adiposo, este no es promovido por la insulina, pues otras hormonas tiene que ver con este proceso como son las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), la hormona de crecimiento, el cortisol y el glucagón [44,45].

Es importante mencionar que durante la hipoglucemia (niveles bajos de glucosa que pueden ir de 80 a 55 mg/dL) la cual puede darse durante un estado de ayuno o ejercicio intenso, pueden mantenerse a través de dos mecanismos principalmente desarrollados en el hígado. El primero denominado gluconeogénesis; que resulta de la generación de glucosa a partir de fuentes que no son carbohidratos; como proteínas, lípidos, piruvato o lactato. Y el segundo conocido como glucogenólisis; que es la degradación del glucógeno a glucosa y como mencionamos, también se almacenan tanto en hígado como en músculo. También, durante el ayuno y el ejercicio, se favorece la tasa de oxidación de ácidos grasos en el músculo, y aumenta la tasa de síntesis de colesterol en el hígado [46].

Debido a que el metabolismo de carbohidratos mantiene la homeostasis del organismo, es necesario que el estado nutricional del cuerpo sea monitoreado y regulado. El hipotálamo es un órgano del sistema nervioso central capaz de interpretar e integrar diferentes señales del medio ambiente por medio de

núcleos de células específicas [47]. A través de estas señales, se mantiene la homeostasis del organismo mediante la regulación de funciones vitales que incluyen ciclos de sueño, temperatura corporal, flujo sanguíneo, respuesta al estrés, respuesta inmune, así como también la regulación del consumo y gasto de energía como se discutirán a continuación [48,49].

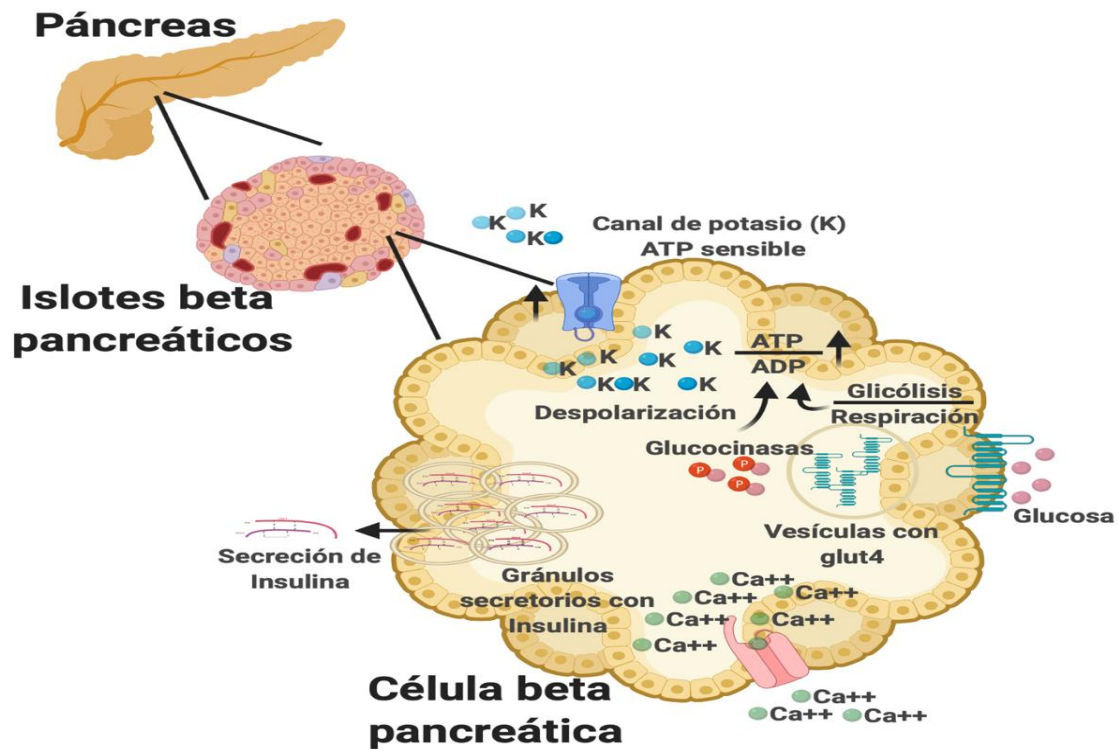


Figura 2. Liberación de la insulina por células beta pancreáticas.

La insulina es sintetizada como preproinsulina de 110 aminoácidos, y después pasa por la membrana de retículo endoplasmático y es modificada postranscripcionalmente, para dar lugar a la proinsulina de 86 aminoácidos. Finalmente, es procesada para generar la insulina madura con 51 aminoácidos y 3 puentes de disulfuro. De esta forma, la insulina asegura su correcto plegamiento pues de lo contrario, un mal plegamiento de la insulina ocasiona la pérdida de su función lo cual podría causar el desarrollo de diabetes. La insulina es empaquetada y guardada en gránulos secretorios acumulados en el citoplasma. A medida que los transportadores GLUT4 introducen la glucosa al interior de la célula, ésta es fosforilada por la glucocinasa, lo que causa un aumento en el cociente de la concentración del adenosín trifosfato entre el adenosín difosfato [ATP/ADP]. Esto ocasiona el cierre de los canales de potasio (K⁺). El aumento en la carga positiva al interior de la célula despolariza la membrana y activa los canales de calcio (Ca⁺⁺), por lo que se introduce este ion a la célula. El rápido aumento de calcio [Ca⁺⁺] desencadena la exocitosis de la insulina de los gránulos secretorios al exterior de la célula.

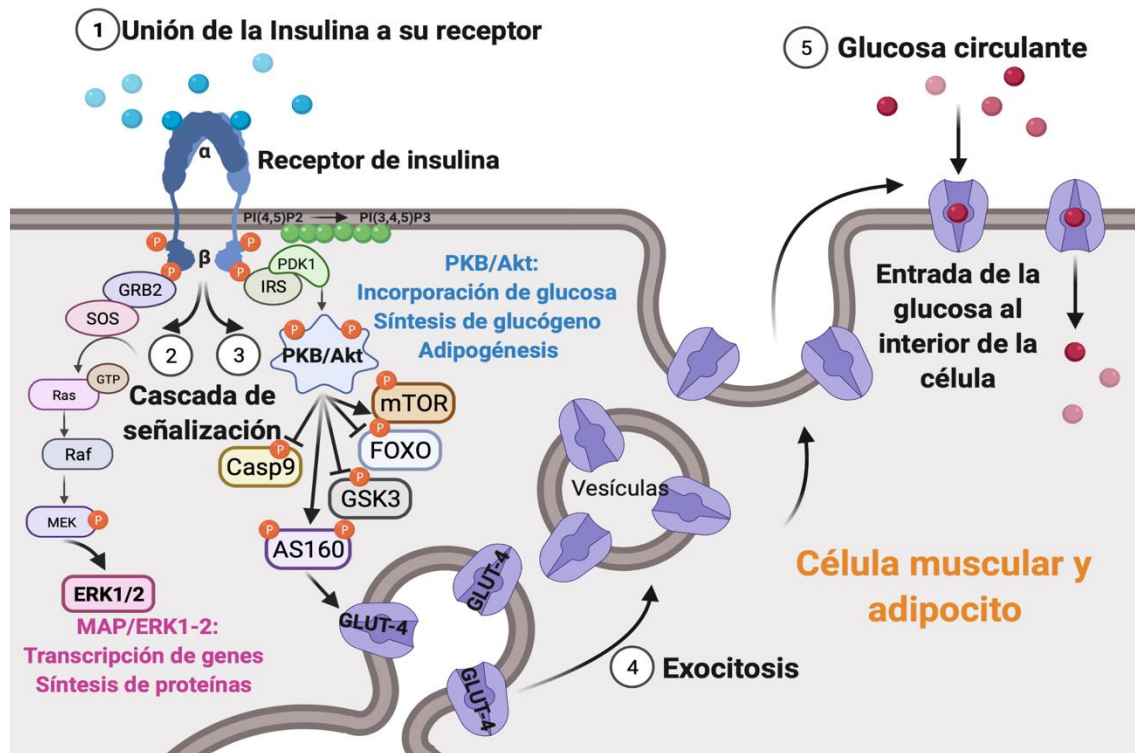


Figura 3. Mecanismo de acción de la insulina.

La insulina secretada por las células β pancreáticas circula por el torrente sanguíneo, tiene una vida media de 3 a 5 min hasta reconocer a su receptor de superficie (1). El receptor de la insulina (IR) consta de 2 subunidades α que se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y 2 subunidades β que tienen una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular donde se localiza el dominio con actividad cinasa de tirosina (Tyr). Tras la unión de la insulina al receptor, éste se activa y se autofosforilan los residuos de Tyr, lo cual, a su vez, activa a IRS al fosforilarlo en residuos de Tyr. Es así, como se da inicio a una cascada de señalizaciones que dependen de una fina regulación y de un gran número de interacciones proteicas (2-3). En el caso de aprovechar la glucosa, el resultado final se da tras la activación de PKB/Akt, con ello se promueve la fosforilación de AS160, la cual participa en el tráfico vesicular de GLUT4 (4). De esta forma, GLUT4 es translocado a la membrana celular y puede introducir glucosa circulante al interior celular (5).

Control del consumo y gasto energético; el hipotálamo como regulador central de la homeostasis energética.

Debido al problema de salud que representa la obesidad y las alteraciones que causa en organismo, se ha logrado un gran avance en la búsqueda de tratamientos y estrategias para contrarrestar dicha condición y alteraciones. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre la regulación de la ingesta y el gasto energético, ha derivado de estudios relacionados con el ayuno o con obesidad en modelos animales y en humanos. De acuerdo con varios estudios, el hipotálamo es capaz de regular varias funciones vitales entre las que se encuentra la ingesta y el gasto energético, esto mediante diferentes tipos de células las cuales conforman el núcleo arquato (ARC) [50].

Dicho antes, luego de la digestión de los alimentos y en respuesta al incremento de los niveles de glucosa en sangre, se libera insulina de las células β pancreáticas, así como leptina que es una hormona secretada fundamentalmente por el tejido adiposo (adipocina), además de otras hormonas gastrointestinales que regulan la saciedad [23,51]. Los niveles en circulación tanto de insulina como de leptina son proporcionales a los niveles de glucosa y grasa corporal, respectivamente. Además, ambas hormonas tiene la capacidad de acceder al hipotálamo a través de un sistema de captación especializado [52,53].

En el ARC, dos poblaciones neuronales se encargan de regular y mantener la homeostasis energética del organismo; las neuronas anorexigénicas que producen el péptido estimulante de los melanocitos (α MSH) derivado de pro-opiomelanocortina (POMC), y al péptido relacionado a la cocaína y amfetamina (CART), a través de ellos promueven la saciedad y el gasto energético. Mientras que las neuronas orexigénicas expresan tanto el péptido relacionado con agouti (AgRP), como el neuropéptido Y (NPY) y con ello se promueve el apetito [54].

Así, a través de estas poblaciones neurales, la insulina y la leptina regulan el balance energético. Por un lado, los niveles elevados tanto de la leptina como de la insulina inhiben la función de las neuronas orexigénicas, por lo que se inhibe la ingesta de alimentos, y se promueve el gasto energético (Figura 4) [50,52,55]. En un estado de ayuno, los niveles bajos de leptina serán detectados por las poblaciones neuronales orexigénicas y se impulsará el aumento del apetito. De igual forma, la grelina una hormona que se produce predominantemente en el estómago, también aumenta el apetito y la deposición de grasa, a través de inducir la producción de NPY y AgRP y reduce la producción y liberación de POMC (Figura 4) [56,54,57].

Es importante dejar en claro que la participación de las adipocinas, así como la insulina, tienen la capacidad de controlar funciones en otros órganos además del cerebro y el tejido adiposo, como son el hígado, el músculo y el estómago (Figura 5), pero para fines del proyecto no daremos detalles.

Establecimiento del proceso inflamatorio en el eje hipotálamo-órganos metabólicos.

La regulación del balance energético requiere de una comunicación de los procesos llevados a cabo en el cerebro, el tracto digestivo y los órganos metabólicamente activos, es decir, entre el hipotálamo y el tejido adiposo específicamente (Figura 5) [58,59]. Como mencionamos anteriormente, el consumo cotidiano de alimentos con un alto contenido calórico, la falta de ejercicio físico (gasto de energía disminuido), el sedentarismo, entre otros factores que pueden ser genéticos, por ejemplo. Causan alteraciones en las vías que controlan la ingesta y el gasto energético tanto en el hipotálamo como en órganos de la periferia. Esto a la larga contribuye al desequilibrio del metabolismo energético, y finalmente culmine en el sobrepeso u obesidad, que eventualmente dará paso al desarrollo de alteraciones en la homeostasis del metabolismo de glucosa y lípidos [60,61].

Con respecto a las alteraciones en las vías de señalización llevadas a cabo en el hipotálamo, estudios en murinos han demostrado la existencia de un ambiente inflamatorio en dicho órgano ocasionado justamente por el exceso calórico [60]. En dichos modelos, se han identificado niveles elevados de mediadores inflamatorios tales como IL-1 β , TNF e IL-6, y éstos correlacionan con la resistencia a leptina e insulina mostrada en la obesidad [62,63]. También se ha identificado una mayor activación de cinasas como JNK (cinasas c-Jun N-terminal) e IKK/NF- κ B (factor nuclear kappa B), y con ello se ha visto una regulación negativa de la vía de señalización tanto de la insulina, como de la leptina, por lo que favorecen su resistencia, y esto contribuye a que se alteren mecanismos homeostáticos en el hipotálamo [64,65].

Dicho proceso inflamatorio no solo ocurre en el hipotálamo en un estado de obesidad, si no que también se ha determinado en otros órganos como el tejido adiposo de animales e individuos humanos obesos [66]. Sobra decir que, este proceso inflamatorio tiene un impacto negativo en las funciones de otros tejidos como el muscular y hepático, por lo que se promueven perturbaciones en sus funciones manifestándose finalmente alteraciones metabólicas [66]. Esto deja en claro que la inflamación asociada a la obesidad resultante del exceso energético, acelera el desarrollar alteraciones en la homeostasis del metabolismo de carbohidratos y lípidos.

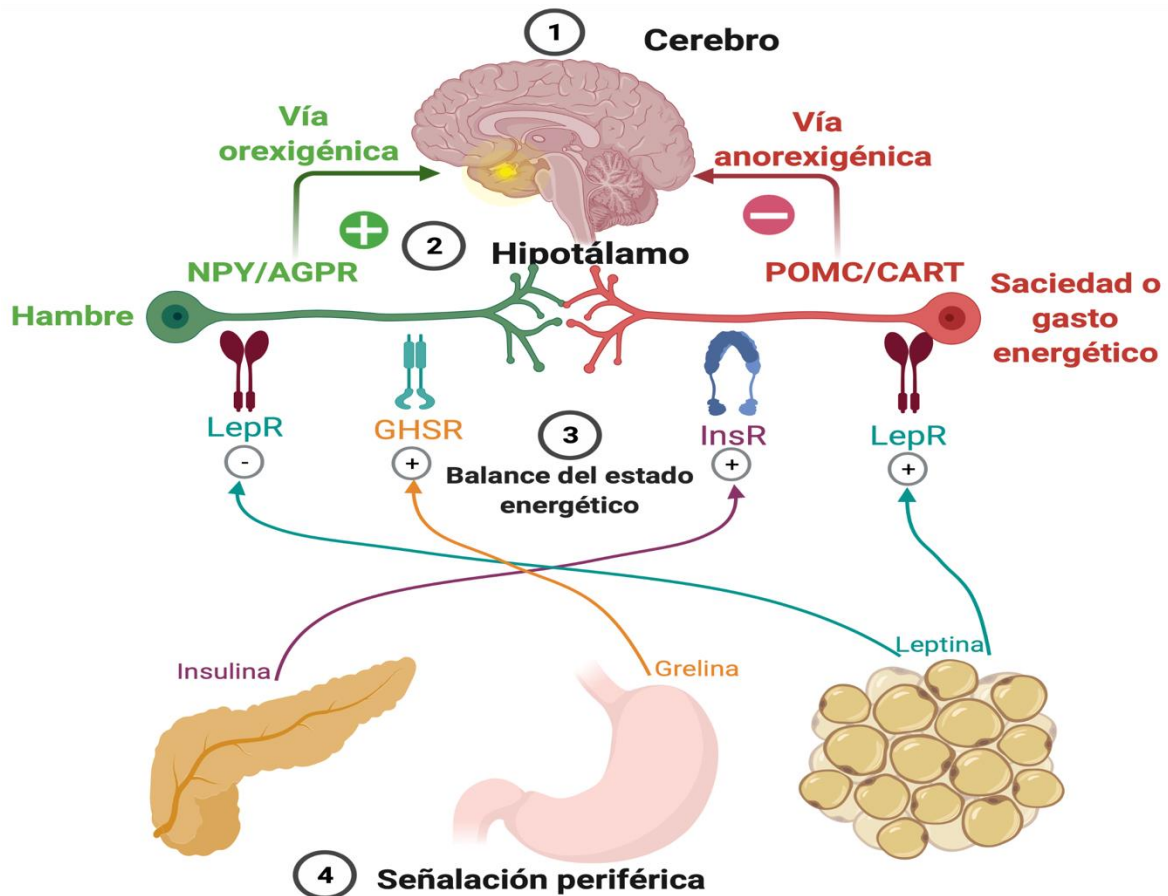


Figura 4. Circuito hambre-saciedad y regulación energética.

En el cerebro (1) el balance energético depende de las señales compensatorias censadas por el núcleo hipotalámico (2). La ingesta de alimentos (vía orexigénica) se promueve mediante la unión de la grelina al receptor GHSR en las neuronas NPY/AgRP, bloqueando la señalización anorexigénica. La leptina y la insulina se unen a sus receptores específicos en las neuronas POMC/CART, lo que promueve la saciedad y el gasto energético (vía anorexigénica). Además, la leptina y la insulina en las neuronas NYP/AGRP inhiben la señalización de AgRP (3). Toda la regulación energética es mediada por hormonas liberadas de órganos periféricos, que de acuerdo a su estado las secretan para promover la saciedad o el hambre (4).

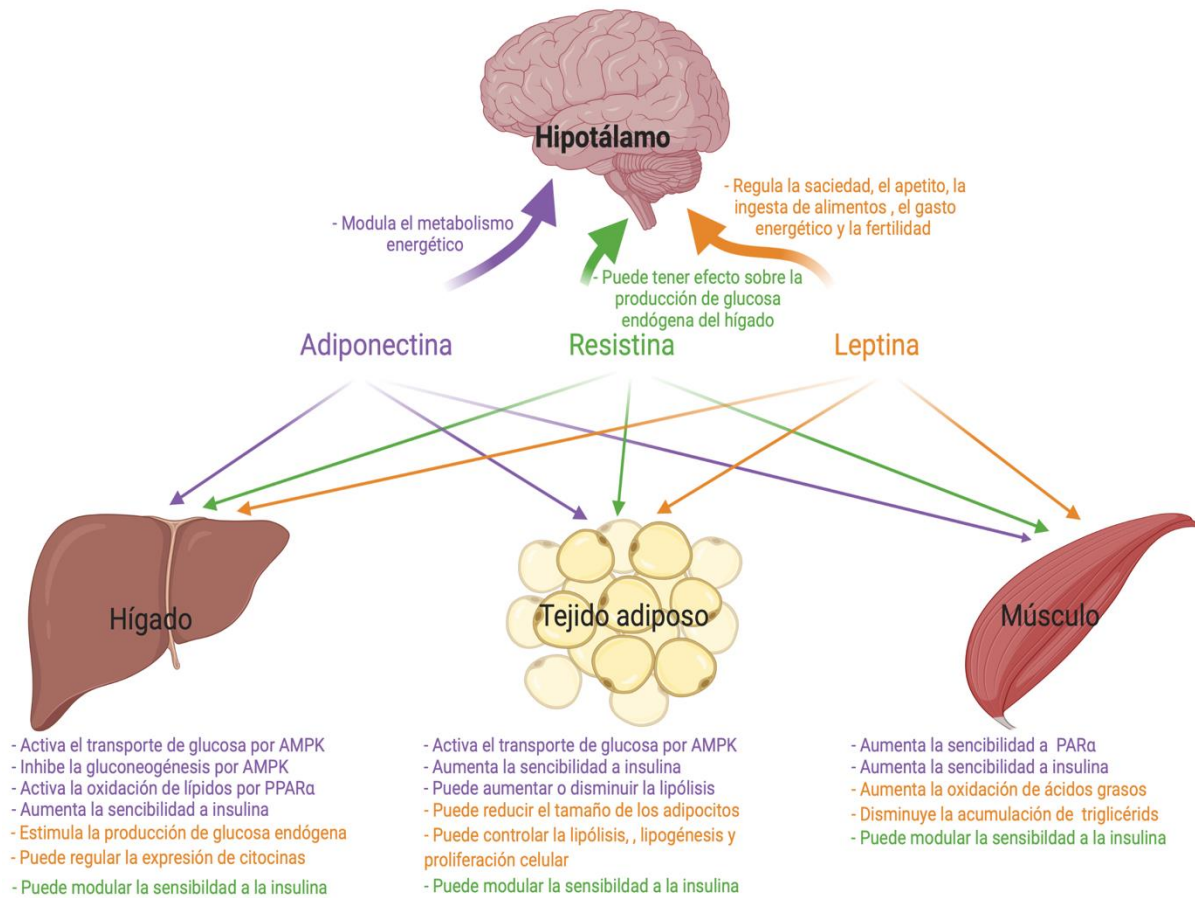


Figura 5. Comunicación entre adipocinas con órganos metabólicamente activos.

La investigación del metabolismo ha logrado establecer al adipocito como un mediador central en la regulación de la homeostasis sistémica de nutrientes y energía. Sin embargo, el músculo y el hígado también tienen un papel importante al operar en múltiples niveles del control del metabolismo. De acuerdo con esto, en los diferentes órganos involucrados en el metabolismo destaca la participación de 3 adipocinas críticas: la adiponectina, la resistina y la leptina.

Desarrollo del proceso inflamatorio en el tejido adiposo.

En los últimos años, el tejido adiposo se ha convertido en un foco central de estudios sobre los mecanismos implicados en las alteraciones y enfermedades relacionadas con la obesidad. En el ser humano el tejido adiposo está compuesto principalmente por el tejido adiposo blanco (WAT, siglas en inglés) que almacena energía en forma de TG [67]. Mientras que el tejido adiposo marrón (BAT, siglas en inglés) a través de disipar energía produce calor, por lo que es responsable de la termogénesis [44]. Para fines del proyecto nos centraremos sobre las características del WAT.

El WAT tiene una función importante en la homeostasis del organismo, pues más allá de ser un órgano con la capacidad de almacenar reservas lipídicas, las cuales pueden ser utilizadas de acuerdo a la demanda energética de cada individuo [68], es también un tejido con actividad endocrina. Esto se debe a su capacidad de secretar una gran variedad de adipocinas como la leptina que tiene efecto en el hipotálamo y regula tanto la ingesta como la saciedad, tal como se mencionó previamente [67].

Se ha evidenciado que el WAT tiene un papel central en la progresión hacia la fisiopatología de alteraciones metabólicas. Se ha postulado que la obesidad inicia con el exceso de adiposidad y que existe una correlación positiva entre una mayor acumulación de grasa (IMC >25), con el desarrollo de DM2 y ECV [69,70]. Esto plantea la posibilidad de la existencia de una disfunción del tejido adiposo con trastornos y complicaciones relacionadas con enfermedades metabólicas [71,72].

Este aumento de la adiposidad resultante del exceso calórico, se debe a que los adipocitos tienen la capacidad de incrementar tanto su tamaño (hipertrofia), como su número (hiperplasia, Figura 6) [73]. De manera interesante, el tamaño de los adipocitos tiene una correlación inversamente proporcional con la sensibilidad a la insulina, ya que, individuos obesos que presentan adipocitos de mayor tamaño, muestran menor sensibilidad a la insulina, mientras que aquellos con adipocitos más pequeños muestran mayor sensibilidad [74,75].

De igual forma, con la excesiva expansión del WAT aumentan las necesidades nutricionales y de oxigenación, las cuales debido al exceso de adiposidad no son completamente abastecidas de manera homogénea, lo que resulta en que los adipocitos hipertróficos se encuentren en constante estrés [76]. Esto induce la producción de especies reactivas de oxígeno que en conjunto con el desabasto de nutrientes, promueven su muerte [77]. La liberación del material celular al medio extracelular como resultado de esta muerte, induce una respuesta inflamatoria estéril (no microbiana, Figura 6), ya que, dicho material es censado como una señal de daño al ser reconocido por sus patrones moleculares asociados a daño (DAMP, siglas en inglés) [78].

Establecimiento del proceso inflamatorio en el tejido adiposo, la metainflamación.

Si bien se reconoce que los DAMPs pueden inducir una respuesta inmune la cual después de un tiempo puede volver a homeóstasis, actualmente se propone la existencia de otros tipos de patrones moleculares capaces de inducir una respuesta inmune estéril, la cual no es resuelta por los mediadores inmunes [79]. Dichos patrones reconocidos son producidos por el estilo de vida industrializado que actualmente se lleva, por lo que han sido denominados LAMP (patrones moleculares asociados al estilo de vida, por sus siglas en inglés) [79].

Entre los diversos DAMPs capaces de inducir una respuesta inflamatoria y que se encuentran constantes en un estado de obesidad son; altas concentraciones de ácidos grasos libres [80], altas concentraciones de glucosa [81], ATP [82], y ceramidas [83], mientras que esfingolípidos como el colesterol son ejemplos de LAMPs [84,85].

De esta forma, tanto DAMPs como LAMPs son reconocidas por una amplia gama de células centinelas como son los macrófagos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, basófilos, entre otras células residentes del WAT, las cuales tienen capacidad de promover una respuesta inmune [79]. Como sabemos en condiciones normales, dichas células tienen la función primordial de eliminar los restos celulares y mantener la homeóstasis de órganos a través de un estado antiinflamatorio o M2 [86]. Sin embargo, debido al constante estrés en el WAT causado por la hipertrofia e hiperplasia de la obesidad, en conjunto con el reconocimiento de DAMPs y LAMPs, se promueve un ambiente proinflamatorio o M1, caracterizado por la constante producción de citocinas inflamatorias, como discutiremos más adelante [87].

Debido a este estado inflamatorio, se ha propuesto un nuevo concepto a la inflamación relacionada con las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, es decir, debido al exceso de nutrientes y excedentes de origen metabólico se le ha denominado “metainflamación” (Figura 6) [88]. Ya que a diferencia del concepto clásico de la inflamación, al ser reconocidos estos excedentes metabólicos por mediadores inmunes, se generan y activan moléculas y vías de señalización inflamatorias clásicas [88,89]. Debido a su persistencia, se tendrá como consecuencia la afectación de órganos metabólicos y la promoción de diversas enfermedades como DM2, ECV, entre otras [90,91].

El papel de algunos componentes inflamatorios y estructuras en la metainflamación.

Con respecto a algunos componentes inflamatorios involucrados en la exacerbada respuesta inflamatoria en el WAT inducida por la obesidad, se han reportado altos niveles de la caspasa-1 (Casp-1) la cual es considerada una caspasa proinflamatoria [92], así como también altos niveles de la citocina

proinflamatoria IL-1 β [93]. La producción de ambas citocinas está relacionada con un tipo de muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis [94]. Por ello, se especula que en una condición de obesidad, los adipocitos podrían morir por piroptosis lo que contribuiría al aumento del estado inflamatorio [95].

Cabe mencionar que la activación de Casp-1 está regulada por complejos multiproteicos citoplasmáticos denominados inflamasomas, considerados análogos al apoptosoma [92]. Uno de los inflamasomas mayormente estudiados y que tiene la capacidad de activar a Casp-1, es el inflamasoma Nlrp3 del cual se darán detalles mas adelante [83]. Una vez activa la Casp-1, es capaz de procesar a la IL-1 β [96]. Existen numerosos reportes en los cuales se ha relacionado la activación de estas citocinas con la promoción de la metainflamación en el WAT y que contribuyen al desarrollo de alteraciones metabólicas [97-99].

Por otro lado, la muerte de adipocitos hipertróficos y la liberación de su contenido al medio extracelular (DAMP), conducen a un mayor reclutamiento y activación de macrófagos [100]. Se ha evidenciado que este reclutamiento de macrófagos en el WAT conduce a la formación de estructuras atípicas en forma de corona (crown-like structures; CLS) [101]. Las CLS se relacionan con la promoción de la metainflamación [102], pues datos obtenidos en modelos animales alimentados con dietas altas en grasa (DAG), dejan en claro una correlación positiva entre el tiempo de alimentación con la DAG, con el aumento de las CLS y con ello, el aumento de la IL-1 β [76,103], lo que correlaciona con la resistencia a la insulina [68]. Por lo tanto, la aparición de las CLS en un estado de obesidad, sugiere cambios no solo en la estructura del tejido adiposo, sino también el establecimiento del estado proinflamatorio crónico y sostenido, caracterizado por la constante secreción de citocinas proinflamatorias (Figura 6) [73-104].

Esta bien caracterizada la participación de los macrófagos y la polarización de la respuesta inmune de M2 a M1 en el WAT [105]. Sin embargo, no se descarta la participación de otras células inmunes residentes en este tejido, de hecho, se ha discutido el potencial terapéutico de otras células inmunes residentes en el WAT con el objetivo de abordar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de las enfermedad relacionadas con alteraciones metabólicas ocasionadas por la obesidad [106]. Sin embargo, para fines del proyecto no daremos más detalles.

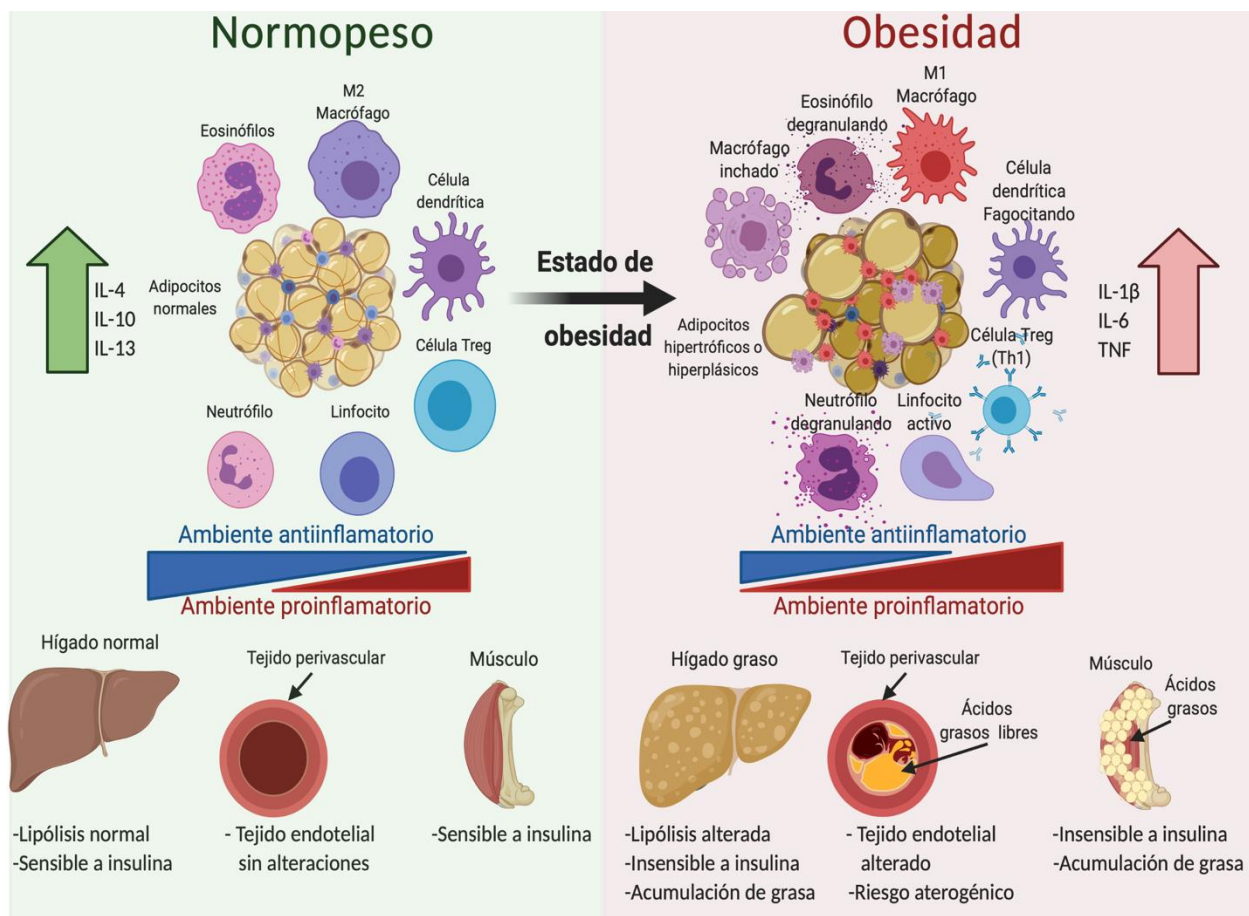


Figura 6. Comunicación entre células inmunes y órganos metabólicamente activos.

El tejido adiposo se encuentra en comunicación con los órganos donde se involucra la nutrición, el metabolismo y la inmunidad. Las células inmunes residentes en el tejido adiposo tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis local, así como de otros órganos. Los cambios inducidos por la obesidad afectan tanto el número, como el tamaño de los adipocitos, e inducen un reclutamiento mayor de células inmunes, las cuales dan como resultado la activación de una respuesta inflamatoria local (tejido adiposo) y sistémica (metainflamación). Se propone a la inflamación del tejido adiposo como un mecanismo central que se induce por la obesidad, y que se conecta con varias complicaciones metabólicas a través de otros tejidos y órganos. Esto contribuye en gran medida a desarrollar enfermedades como la DM2, hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, entre otras.

El mecanismo molecular de la fisiopatología ocasionada por la obesidad.

El metabolismo de carbohidratos es de gran relevancia [107,108], ya que de existir perturbaciones, esto conlleva a alteraciones severas en todo el organismo [109,110]. Es importante definir el mecanismo molecular y la participación de otros componentes inmunes que subyacen a estas alteraciones metabólicas desencadenadas por la obesidad.

De acuerdo con lo que hemos mencionado anteriormente, en una condición de obesidad la infiltración de macrófagos en el WAT tendrá un papel importante en promocionar la metainflamación afectando principalmente órganos metabólicamente activos [137]. Esto, a través de la constante secreción de citocinas inflamatorias como Casp-1 e IL-1 β que promueven la resistencia a la insulina considerada uno de los principales predecesores de la patogénesis y etiología de la DM2 [138].

Algunas otras vías inflamatorias activadas por diferentes citocinas en órganos insulino-dependientes, involucran la participación de diversas cinasas de serina y treonina (Ser/Thr), que en conjunto, bloquearán de forma específica la vía de acción de la insulina y de esta forma se da paso a la resistencia a la insulina [113,114]. Entre las Ser/Thr cinasas relacionadas con la obesidad y la resistencia a insulina se encuentran; JNK, PKC, mTOR, S6K, IKK, y ERK1/2 ().

Las cinasas inducirán la fosforilación de diferentes residuos de Ser en el IRS-1, lo que deriva en varios efectos negativos: (a) conducen a la inhibición de la fosforilación de Tyr de IRS-1; (b) reducen el nivel de proteína de IRS-1 (acelera la degradación de IRS), (c) reducen la asociación de IRS-1 con PI3K, por lo que todos estos eventos contribuyen a la inhibición de la función IRS-1 y la pérdida del efecto de acción de la insulina [115-118]. Algunos de los residuos Ser de IRS-1 fosforilados por estas cinasas e involucrados en la inhibición de la acción de la insulina son: la Ser302, Ser307 (Ser312 en humanos), Ser318, Ser612 (Ser616 en humanos), Ser632, Ser789 (Figura 7) [119].

El papel de las citocinas en la fisiopatología ocasionada por la obesidad.

La actividad de JNK e IKK puede ser modulada por citocinas inflamatorias como TNF [120], de esta forma pueden inhibir la vía de señalización del IR, por lo que, algunas citocinas son consideradas marcadores biológicos en una condición de obesidad [121]. Dentro de las citocinas proinflamatorias que están directa o indirectamente relacionados con la resistencia a insulina en un estado de obesidad se encuentran: TNF, IL-6, IL-1 β , IL-18, así como algunas quimiocinas (Figura 7) [122].

De hecho, el primer vínculo reportado donde se asoció la obesidad con un estado de inflamación fue cuando Hotamisligil y colaboradores, [123] observaron un aumento en la expresión de la citocina

proinflamatoria TNF en el tejido adiposo de 4 cepas diferentes de roedores modelos de obesidad y diabetes. Posteriormente, se demostró que ratones que carecían de TNF o sus receptores, mostraban mayor sensibilidad a la insulina a pesar de ser alimentados con una DAG [124,125].

El mecanismo por el cual IL-6 induce resistencia a la insulina es complicado y controversial [126]. Debido a que se estima que un tercio de la IL-6 circulante en individuos sanos, se origina en el tejido adiposo, por lo que la IL-6 es considerada también una adipocina [127]. Sin embargo, a pesar de que los adipocitos secretan una fracción de IL-6, se sabe que la otra parte es producida particularmente por los macrófagos [113]. Al igual que TNF, los niveles de IL-6 en plasma de humanos correlacionan con el aumento de la masa corporal, la circunferencia de la cintura y los niveles de ácidos grasos libres [128], además, se ha reportado que ésta disminuye con la pérdida de peso [129].

De igual forma, se ha evidenciado que la IL-6 parece tener funciones duales según el tejido y el estado metabólico. Por ejemplo, durante el ejercicio físico la IL-6 aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético, lo que da lugar a la hipertrofia y miogénesis muscular, así como a la oxidación de ácidos grasos mediada por AMPK, además de tener un efecto antiinflamatorio [130]. Por otro lado, en el tejido adiposo y el hígado la IL-6 ejerce actividades proinflamatorias, y aumenta la resistencia a la insulina a través de aumentar la expresión de SOCS3 (supresor de la señalización de citocinas 3), el cual puede unirse a sitios de fosfotirosinas como el sitio Tyr⁹⁶⁰ en el IR y con ello se induce la resistencia a insulina en hígado [131].

Al igual que TNF, IL-6 tiene la capacidad de estimular la lipólisis, por lo que se aumentan las concentraciones de ácidos grasos libres, y de esta forma se promueve la resistencia a la insulina [132]. Esto nos habla de que la IL-6, puede desempeñar un papel fundamental en la homeostasis del metabolismo, así como en la promoción de las enfermedades metabólicas, por tanto, es importante comprender y aclarar su papel en la regulación del metabolismo.

Con respecto a la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, se ha observado que la responsable de esto es principalmente la proteína quimioatrayente de monocitos conocida como quimiocina-1, MCP-1, CCL2 o JE, secretada por adipocitos hipertróficos, pues individuos humanos obesos presentan mayores niveles de esta quimiocina [133]. Otras quimiocinas involucradas en la metainflamación ocasionada por la obesidad son; MCP-1-4/CCL2, MIP-1 α/β [134]. Varios estudios indican que la deficiencia de MCP-1/CCL2 previene la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas en ratones [135,136]. Mientras que, la sobreexpresión de MCP-1 en el tejido adiposo aumenta la infiltración de los macrófagos, y esto correlaciona con la resistencia a la insulina [135,137].

Con respecto a la IL-1 β e IL-18, se sabe son mediadores proinflamatorios maestros los cuales desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión de otras citocinas, adipocinas y quimiocinas proinflamatorias. Así mismo, se ha demostrado tienen una participación en el metabolismo energético, lo cual se discute más adelante [138].

Otros metabolitos inducidos en la obesidad contribuyen a la fisiopatología.

Además de la regulación negativa en la vía de señalización del IR o del IRS mediada tanto por cinasas o citocinas proinflamatorias promovidas por células inmunes, se ha descrito que ciertos metabolitos asociados a la obesidad (DAMPs y LAMPs), pueden también bloquear la vía de señalización de la insulina como ya habíamos mencionado anteriormente (Figura 7).

En este aspecto, la exposición de células β -pancreáticas de rata a niveles elevados de glucosa, no solo moduló la expresión del gen de insulina [139], sino que también, niveles elevados y crónicos de glucosa inhibieron su expresión. El deterioro prolongado en la transcripción del gen de la insulina ocasionó la pérdida de la capacidad de sintetizar la insulina adecuada para controlar la glucosa en sangre [139].

De igual forma, los ácidos grasos libres en circulación en organismos obesos desempeñan un papel crítico en la promoción de estrés y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos. Esto se demostró al observar un aumento en la fosforilación de la cinasa del retículo endoplasmático (ER) pancreática o cinasa similar a PKR (PERK Thr⁹⁸⁰), así como el aumento en la fosforilación de la subunidad del factor de iniciación de la traducción tipo 2 (eIF2 α Ser⁵¹) y p-JNK en hígados de ratones alimentados con una DAG por 16 semanas en comparación con animales con dieta normal (DN) [140].

En el caso de la línea celular de hígado 293T estimuladas con ácido oleico/palmítico (200uM), observaron mayor activación de NF- κ B, así como mayor p-JNK y esto correlacionó con el aumento en los niveles de TNF [141]. Estos datos sugieren un vínculo molecular entre la nutrición, los lípidos y la inflamación, y como el sistema inmunológico innato participa en la regulación del equilibrio energético y la resistencia a la insulina en respuesta a los cambios en el entorno nutricional.

Se ha demostrado que los ácidos grasos pueden activar tanto IKK y por ende a NF- κ B a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4) [142]. Esto se demostró en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 estimulada con ácidos grasos insaturados, así como en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa por 8-10 semanas. Con ello se observó que por medio de los ácidos grasos se promueve el desarrollo de la resistencia a la insulina.

De igual forma, la participación de otros metabolitos lipídicos elevados durante la obesidad como el diacilglicerol (DAG, lípido intramiocelular) y las ceramidas esfingolípidas, inducen resistencia a la insulina. Pues el aumento del DAG muscular condujo a la resistencia a la insulina muscular al activar PKC e inducir la fosforilación de IRS-1 en la Ser³⁰⁷ [143]. Sin embargo, al reducir los niveles del DAG en el músculo esquelético, y el hígado se previno el desarrollo de resistencia a la insulina inducida [144].

Por otro lado, se observó que las ceramidas indujeron resistencia a la insulina al inhibir la activación en otro punto clave de la vía de insulina como es Akt en el residuo Ser⁴⁷³, a través de la activación tanto de PKC y JNK [145]. Esto al disminuir la interacción de la proteína fosfatasa 2 (PP2A) en el dominio de la fosforilación de Thr³⁴ en Akt, lo que resulta en una disminuida interacción del dominio PH de Akt con PIP3 [146-148]. De igual forma, al inhibir la síntesis de ceramidas mejoró la señalización en la vía de la insulina, por tanto, se disminuyeron las alteraciones metabólicas [149].

En conjunto, todos estos datos indican qué en condiciones de obesidad, múltiples factores, mediadores celulares, estímulos y metabolitos tienen la capacidad de activar vías de señalización donde ciertas cinasas (JNK, IKK, ERK, PKC, entre otras) y citocinas tienen la capacidad de bloquear la vía de señalización de la insulina y conducir al desarrollo de alteraciones metabólicas que pueden resultar en DM2 [150-154].

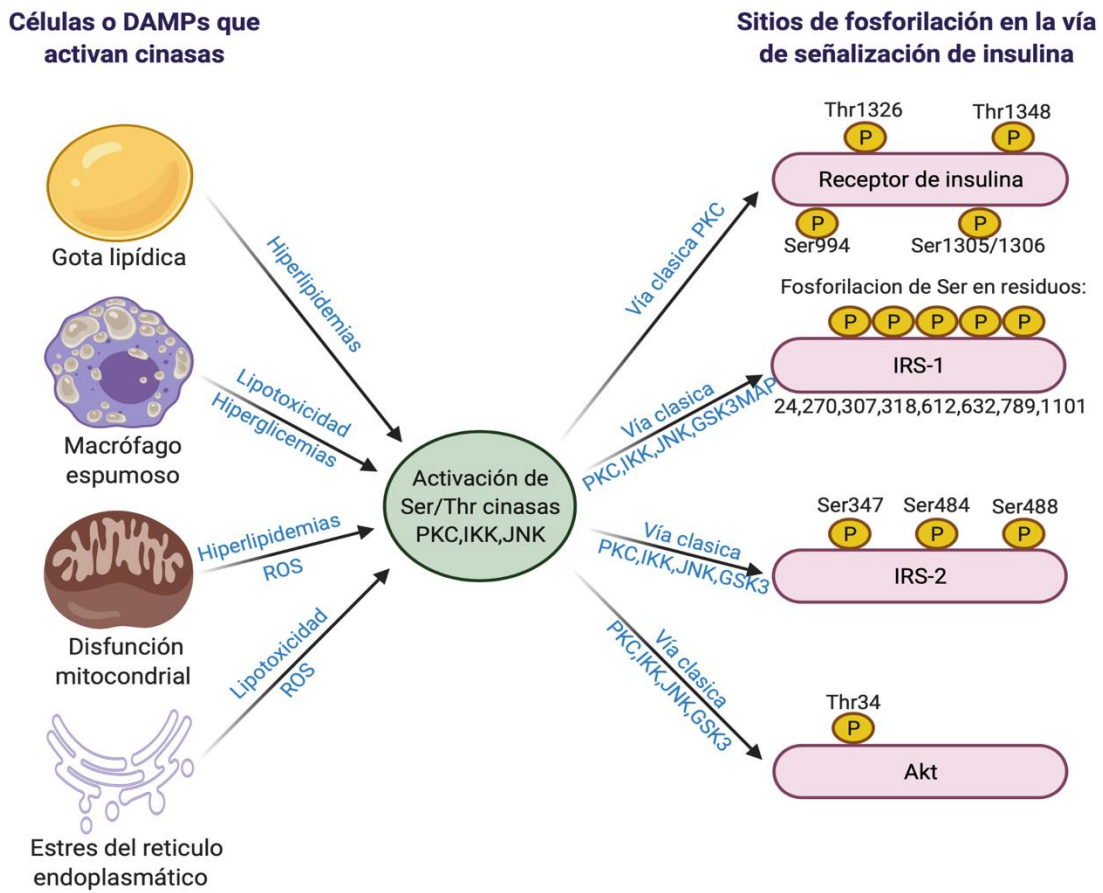


Figura 7. La activación de cinasas de Ser/Thr por distintas señales provoca la fosforilación inhibidora de nodos específicos en la vía de señalización de la insulina.

La lipotoxicidad, la hiperglicemia, e hiperlipidemias genera la producción de especies reactivas de oxígeno que contribuye a la disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático (ER), lo cual activa las cinasas Ser/Thr, que a su vez induce la fosforilación inhibidora de Ser/Thr de las proteínas IR, IRS y Akt en múltiples residuos que provocan resistencia a la insulina.

Los NLRs sensores guardianes de la homeostasis.

Entonces, la muerte de adipocitos por falta de nutrientes y un microambiente hipóxico, genera una gran cantidad de señales de daño o DAMPs y LAMPs. Estas señales inducen la activación y el aumento de las poblaciones de macrófagos residentes en el WAT, los cuales aumentarán la producción de citocinas proinflamatorias (Casp-1, IL-1 β), entre otras moléculas inflamatorias [97-99].

De acuerdo con la literatura, el fenotipo M1 de los macrófagos inducido por los DAMPs o LAMPs, se debe principalmente al reconocimiento de estos por parte de receptores de superficie celulares como son los receptores TLRs [155], y receptores intracelulares tipo NOD de la familia de los NLR [156]. Estos últimos son importantes moduladores del sistema inmune innato, cuya capacidad de detección de patrones moleculares no solo se limita a señales de daño, si no también a patógenos como hongos, bacterias incluso virus (PAMPs) [157,158].

Con base en un análisis filogenético del dominio central de unión a nucleótidos (NACHT) de los NLR, quedó claro que este dominio tiene la capacidad de reconocer tanto a PAMPs, como a DAMPs por lo que son considerados importante inmunomoduladores. Debido a esto, los NLR se clasifican en 3 subfamilias distintas: 1) los receptores NOD (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA) [157], 2) los receptores IPAF compuesta por IPAF (NLRC4) y NAIP [156]; y 3) los receptores NLRP (importantes en nuestro estudio) [159]. A la fecha se conocen cerca de 22 genes humanos que codifican para los NLR (NLRP1-NLRP22), y muchos más en el caso del roedores (Figura 8) [159].

Con respecto a la activación de los NLR se han descrito 2 vías; la clásica o canónica en donde se sabe que está determinada esencialmente por 2 pasos [160]. El primer paso requiere de un proceso de "preparación o priming" para generar una respuesta efectora eficiente (Figura 9) [161]. Dicho paso se inicia mediante el reconocimiento de PAMPs o DAMPs los cuales son reconocidos por receptores de membrana TLR (Figura 8). Posteriormente, el priming se logra mediante la activación de la vía del NF- κ B, y el aumento en los niveles de expresión de los componentes del inflammasoma en el caso del NLRP3 sería: Asc y proCaspasa-1 (Casp-1); así como de la proIL-1 β y proIL-18 [162].

En la vía alterna o no canónica, de igual forma se requiere el primer de "preparación o priming" sin embargo, este conlleva a la activación de la caspasa 11 en ratones y caspasa 4/5 en humanos. Posteriormente se activa a Gasdermina en su N-terminal, pero por cuestiones del trabajo no daremos más detalles de este proceso [163].

Antes de mencionar la activación de los inflamasomas, mencionaremos la estructura del inflammasoma Nlrp3 para una mejor comprensión. Éste inflammasoma contiene un dominio rico en leucinas

en el carboxilo-terminal (LRR), un dominio NATCH en el centro y un dominio pirina en el N-terminal (PYD), una proteína adaptadora ASC, la cual contiene un dominio de reconocimiento a PYD, y un dominio a Casp-1 (CARD) se une a PYD para activar a la Casp1 (Figura 8) [164]. Con respecto a la estructura del inflamasoma Nlrp1, a diferencia del Nlrp3 contiene 2 dominios más, el dominio FIND y un dominio CARD, junto con el PYD y LRR [164]. A través del dominio CARD y no del dominio PYD se activa a Casp-1 (Figura 8) [164].

Después del priming el segundo paso es la activación del inflamasoma Nlrp1/3 que inicia una vez que al dominio NATCH se le une un PAMP, DAMP o LAMP, y se da paso a la oligomerización (Figura 8) [158]. Sin embargo, en respuesta a la oligomerización en el caso del inflamasoma Nlrp1, se conforma el dominio CARD-Casp-1 que consta de 2 dominios plegables, y donde el monómero de caspasa es reclutado [165]. Así, CARD-Casp-1 provoca la auto-escisión de la proCaspasa-1 y formación de Casp-1 heterotrimérica activa [166]. En el caso del inflamasoma Nlrp3 en el dominio PYD se une ASC y este recluta al monómero de Casp-1 [166]. En ambos caso, la activación de Casp-1 induce el procesamiento de las citocinas proIL-1 β y proIL-18 a sus formas maduras (Figura 8) [167,168,169].

El inflamasoma NLRP3: crucial para el establecimiento del proceso inflamatorio en el tejido adiposo inducido por la obesidad.

El inflamasoma NLRP3 resulta ser uno de los inflamasomas mejor caracterizados en las alteraciones metabólicas inducidas por la metainflamación tanto en modelos animales como en humanos [98,170]. En sujetos obesos, se ha reportado que en biopsias de tejido adiposo, existe una correlación entre una mayor presencia del inflamasoma NLRP3, así como de la Casp-1 e intolerancia a glucosa en comparación con sujetos delgados [171].

De igual forma, la activación del inflamasoma NLRP3 se ha relacionado con otras alteraciones metabólicas como la aterogénesis inducida por la hiperlipidemia [172,173], resistencia a la insulina [174], además de ser el principal componente inmune relacionado con la inflamación en una condición de obesidad. Es por ello que es considerado un sensor metabólico [175,176,177]. En la mayoría de estos estudios, se encontró un aumento en la expresión del inflamasoma Nlrp3 e IL-1 β en los depósitos de grasa visceral de animales obesos [178], y de igual forma, en estudios de individuos obesos se confirmó esta asociación [171,179,180].

De acuerdo con la literatura, la activación del inflamasoma Nlrp3 es un paso crítico en el proceso de la metainflamación y las alteraciones metabólicas generadas por la obesidad (Figura 9). Ya que en animales deficientes tanto de Nlrp3 [181,182,183], como de los componentes del inflamasoma; Casp-1 [184],

Asc [185], o IL-1 β [93] se ve disminuido el proceso inflamatorio inducido por el exceso calórico y por tanto, también se ve disminuido el desarrollo de alteraciones metabólicas. Estos experimentos confirman que el inflamasoma Nlrp3 es fundamental para el desarrollo de la metainflamación y el desarrollo de alteraciones asociadas a la obesidad.

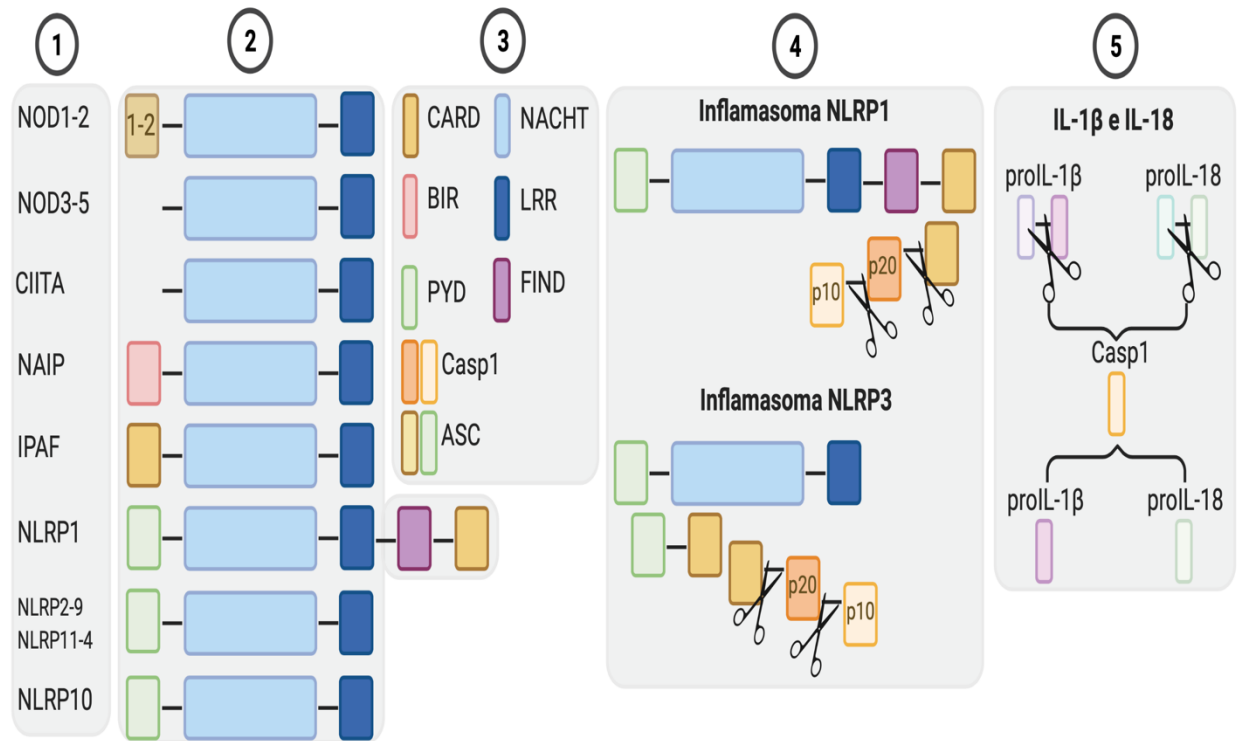


Figura 8. Miembros y estructuras de la familia de sensores tipo NLRs.

1) Nombre de las subfamilias NLRs. 2) Estructuras de los dominios de los NLRs según su clasificación anotada en NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). 3) Código de colores según sus dominios: CARD, dominio de reclutamiento de caspasas; BIR, inhibición baculoviral del dominio de repetición de la proteína de apoptosis; PYD, dominio de pirina; NACHT, dominio de oligomerización y unión de nucleótidos; LRR, dominio con secuencias ricas en leucina y FIIND, dominio con función para encontrar. 4) Tras la activación de los NLRPs, en el caso de NLRP1 activa a Casp-1 al reclutar proCaspasa-1 a través de la interacción con su dominio CARD. En el caso de NLRP3 este activa a Casp-1 al reclutar proCaspasa-1 a través de la interacción con la proteína accesoria ASC, con su dominio CARD-PYD. En ambos casos de activación de los inflammasomas, se conduce a la escisión de la proCaspasa-1 (p20-p10), a caspasa1. 5) Casp-1 promueve la maduración de IL-1 β e IL-18.

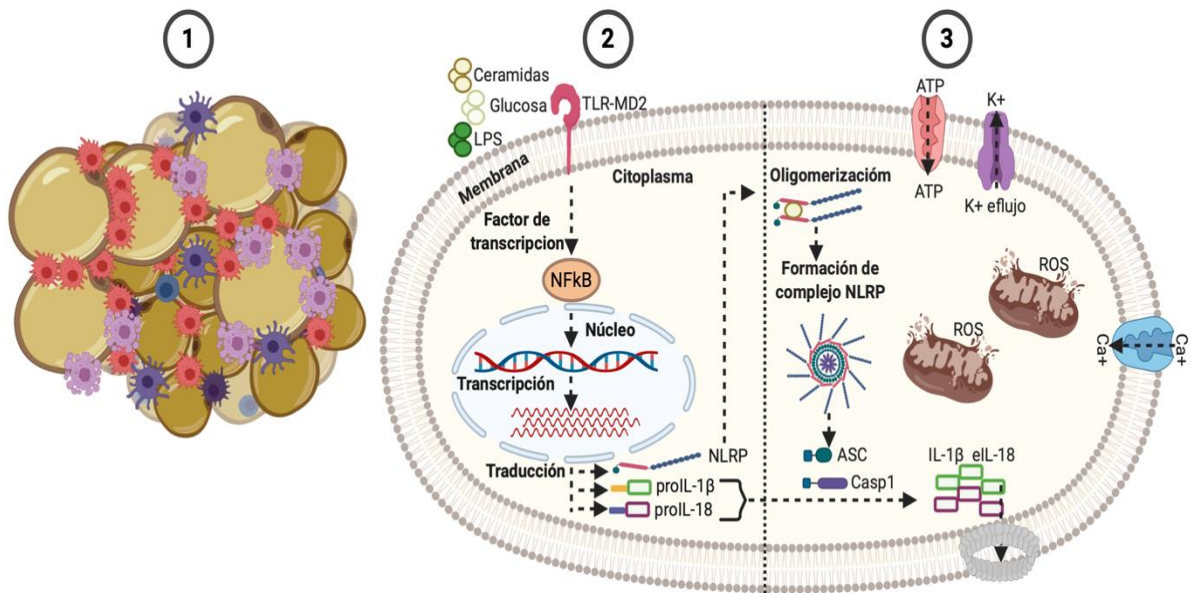


Figura 9. Activación de NLRPs en tejido adiposo en respuesta al consumo de una dieta alta en grasa.

1) La hipertrofia del tejido adiposo conlleva al reclutamiento y aumento de las poblaciones celulares inmunes. 2) Para que pueda ocurrir la primera señal; priming, esta puede ser desencadenada por la amplia gama de interacción por parte de la célula receptora tanto con PAMPs, como con DAMPs; LPS, hiperlipidemias, hiperglicemias. Posteriormente, ocurre la activación de NF-kB, así como la traducción y producción de NLRP3, proCaspasa-1, proIL-1β y proIL-18. 3) La segunda señal o activación, suele ser desencadenada por el estrés celular generado por la producción de ROS, lo que da como resultado la activación y ensamblaje de NLRP3, que conlleva a la activación de la Casp1, responsable de escindir a proIL-1b y proIL-18 en sus formas activas y finalmente desembocará en piroptosis.

Las diferencias metabólicas entre C57BL/6J y Balb/c; el papel del los inflamomas.

De acuerdo a lo anterior, la obesidad conlleva la desregulación del metabolismo de los lípidos [165], así como el deterioro del metabolismo de glucosa [166,167], promovida por la sobreproducción de múltiples factores metabólicos e inmunes como las citocinas inflamatorias Casp-1 e IL-1 β , así como el inflamoma Nlrp3 [168,169], lo que culmina con la resistencia a la insulina [19,145,175]. Actualmente, sabemos que existen diferentes inflamomas, pero su relación con el metabolismo aún no está clara, por lo que definiremos algunas características hasta el momento observadas en algunas cepas de ratones.

Cómo ya se mencionó antes, uno de los factores inmunes claves involucrados en estas alteraciones metabólicas son niveles altos del inflamoma NLRP3 [186-188], así con niveles altos de sus diversos componentes como son ASC y Casp-1 principalmente en el WAT [187]. Sin embargo, se ha evidenciado que ciertas cepas de roedores muestran mayor susceptibilidad a desarrollar alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad que otras. Para fines del proyecto nos enfocaremos en las cepas C57BL/6J y Balb/c, pues existe una clara diferencia entre estas cepas para desarrollar obesidad y por tanto, alteraciones metabólicas [189].

La cepa C57BL/6J, es susceptible a aumentar de peso, y a desarrollar alteraciones en el metabolismo de lípidos inducida por la alimentación con una DAG, en comparación con la cepa Balb/c que a pesar de haber sido alimentada con la misma dieta por 23 semanas no desarrolla obesidad y alteraciones en el metabolismo de lípidos [190].

Incluso, se observó que tanto la cepa C57BL/6J como las cepas 129X1, DBA/2 and FVB/N fueron más susceptibles al desarrollo de la obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, inducida por el consumo de una DAG por 8 semanas, mientras que la cepa Balb/c mostro cierta protección contra estos efectos perjudiciales [191]. Adicionalmente, se ha visto que los ratones Balb/c presentan una mejor tolerancia a la glucosa y menor estrés oxidativo en el hígado, además de ser más sensibles a la insulina, en comparación con la cepa C57BL/6J [192].

Estudios realizados en la cepa C57BL/6J demostraron que la disminuida sensibilidad y alterada secreción de insulina causada por una DAG, es debida a que en sus células β pancreáticas no aumenta el calcio intracelular ante el estímulo con glucosa, por lo que su capacidad para cerrar los canales de K_{ATP} y liberar insulina se ve afectada. Esto sugiere un defecto en la capacidad de secretar insulina de las células β pancreáticas, por lo que eventualmente dará paso al desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, aún bajo una dieta normal [193].

En este sentido, se ha identificado que en la mayoría de las subcepas de C57BL/6J se encuentra una delección de exones en el gen *Nnt* que codifica para la transhidrogenasa (enzima antioxidante mitocondrial) [194,195]. Dicha delección evita la correcta expresión de la proteína Nnt, y como resultado causa incapacidad a los ratones para bajar los niveles de glucosa. Debido a esto, la cepa C57BL/6J es un modelo animal importante para la investigación en diabetes, ya que llega a exhibir intolerancia a la glucosa independiente de la obesidad, condición que se exagera con una DAG [192,193].

A pesar de que la mutación en el gen *Nnt* claramente predispone a los animales de la cepa C57BL/6J a desarrollar obesidad y alteraciones metabólicas en respuesta al exceso calórico, el establecimiento del proceso inflamatorio en el tejido adiposo iniciado por la activación del inflamasoma Nlrp3, es clave. De hecho, los animales deficientes tanto del NLRP3 como de los otros componentes del inflamasoma, se generaron en la cepa C57BL/6J, y a pesar de mantener la mutación en el gen *Nnt* mostraron una disminución en la ganancia de peso, tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina con respecto a ratones silvestres [174,175].

Con respecto a las diferencias en la susceptibilidad a desarrollar obesidad entre las diversas cepas de roedores que pudieran ser debidas por los inflamasomas, se han evidenciado polimorfismos en los genes que codifican para el inflamasoma NLRP1b (Figura 9) [196]. Y dado que, la activación del inflamasoma NLRP1 conlleva a la activación de las citocinas IL-1 β e IL-18, es probable que estos polimorfismos tengan relación con la producción de estas citocinas y, por tanto, con el desarrollo de alteraciones metabólicas.

El inflamasoma NLRP1 como sensor metabólico

En nuestro laboratorio comparamos la secuencia del gen *Nlrp3* tanto de ratones Balb/c, como de ratones C57BL/6J, y resultó que este gen es mono alélico y su secuencia es 100% idéntica en ambas cepas (datos no mostrados). Por otro lado, a pesar de que se conocen otros Nlrps, la participación de estos en un contexto metabólico es poco conocido.

Como mencionamos anteriormente, en los roedores se han identificado 3 genes parálogos del gen *Nlrp1* o *Nalp1*; *Nlrp1a*, *Nlrp1b* y *Nlrp1c* [196]. De acuerdo a un análisis de la secuencia completa del cDNA del gen *Nlrp1b* en 18 cepas de roedores endogámicas, reveló la existencia de 5 alelos polimórficos (*Nlrp1b1*-*Nlrp1b5*) que se expresan de forma diferencial en diversas cepas incluidas la cepas C57BL/6J y Balb/c (Figura 10) [197].

Curiosamente, de las diferentes cepas de roedores que expresan los alelos polimórficos, las cepas C57BL/6J y SJL/J expresan los genes *Nlrp1a* y *Nlrp1c* junto con el alelo *Nlrp1b2*, mientras que las cepas

Balb/c y 129S1 expresan los genes Nlrp1a y Nlrp1c junto con el alelo Nlrp1b1 [196,197]. Esto es relevante ya que, el alelo Nlrp1b2 confiere protección contra la toxina letal de *Bacillus anthracis* (LTx) [198]. De acuerdo con esto, macrófagos de la cepa C57BL/6J en presencia de la LTx, son resistentes y no mueren, dado que posee el alelo Nlrp1b2. Mientras, que la cepa Balb/c que expresa el alelo Nlrp1b1, ante el mismo estímulo con la LTx es susceptible y mueren (Figura 10) [196].

Con respecto a la participación del inflamasoma Nlrp1 en el metabolismo, recientemente Murphy y colaboradores [199] reportaron que en ratones C57BL/6J deficientes del gen Nlrp1, conduce a la obesidad, acompañada del síndrome metabólico, aun cuando los animales son alimentados con una dieta normal. Dentro de sus observaciones discuten la posibilidad de que el fenotipo de obesidad esta dado por la deficiencia de la producción de IL-18 en el tejido adiposo y una lipólisis disminuida [199]. Esto sugiere que el procesamiento de la IL-18 podría depender del inflamasoma Nlrp1.

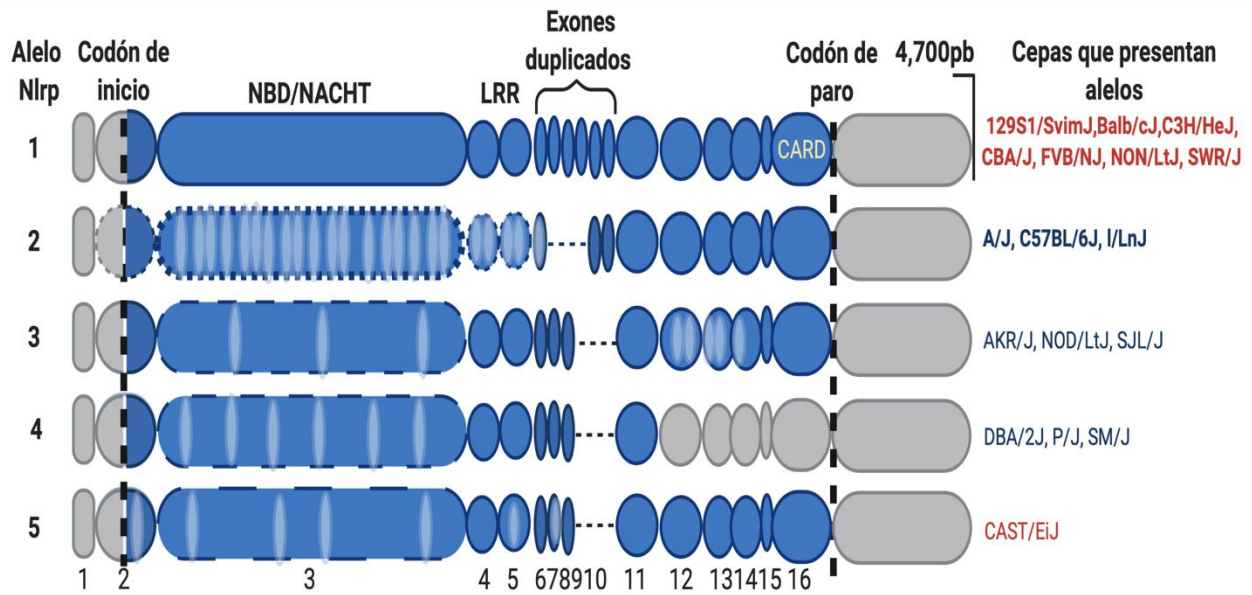


Figura 10. Alelos Nlrp1 y su expresión diferencial en diversas cepas de ratones.

Los óvalos representan exones. Las áreas azules representan el marco de lectura abierto. Se observa el codón de inicio; y codón de paro. Las áreas grises representan regiones sin traducir. Las marcas de trama blanca representan secuencias sin sentido (polimorfismos). De acuerdo con esto, diversas cepas endogámicas de ratones expresan diferentes alelos. En rojo se muestran las cepas que tienen macrófagos susceptibles a LTx; las cepas en azul tienen macrófagos resistentes a LTx. NBD/NACHT, dominio de unión a nucleótidos. LRR; repeticiones ricas en leucina. CARD: dominio de reclutamiento de caspasas. Modificada de Boyden y Dietrich [196].

El papel antagonico de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 en desórdenes metabólicos.

Una vez activos los inflamomas ya sea por PAMPs, DAMPs o LAMPs, tienen la capacidad de activar a la Casp-1, lo cual conlleva al procesamiento de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, por su actividad cisteínproteasa. Con respecto al metabolismo, las citocinas IL-1 β e IL-18 se les ha relacionado a una constelación de alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad como mencionaremos a continuación [96]. Sin embargo, se ha evidenciado que la participación de ambas citocinas en un contexto metabólico al parecer tiene efectos antagonicos.

De acuerdo con diversos estudios, la producción de IL-1 β está ligada principalmente con el estrés metabólico ocasionado por una DAG. De hecho, se ha evidenciado que la IL-1 β es un mediador proinflamatorio maestro que tiene la capacidad de desempeñar un papel fundamental en la activación de numerosas vías inflamatorias [200]. Esto a través de promover diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias y tener un efecto tanto en células β pancreáticas como en diversos tejidos metabólicos, entre otros. (Tabla 1).

Tabla 1. Información sobre el efecto de la IL-1 β en el metabolismo.

| Autor | Condición/Efecto | Conclusión |
|--------------------------------------|--|---|
| Maedler <i>et al</i> ²⁰¹ | Determinaron si la exposición prolongada de las células β pancreáticas con altas concentraciones de glucosa <i>in vitro</i> , inducen la secreción de la IL-1 β . De igual forma, evaluaron si la exposición de las células β pancreáticas a la IL-1 β sola, o en combinación con interferón gama (IFN- γ) y/o TNF inducen la secreción de la IL-1 β . | El deterioro de las células β pancreáticas por la estimulación de IL-1 β , IFN- γ y/o TNF, provoca una marcada disminución de la secreción de insulina. Esto hace suponer que puede ser un factor crucial que contribuye a la patogénesis observada en la DM2. |
| Lagathu <i>et al</i> ²⁰² | Evaluaron el efecto crónico (1-10 días) de la IL-1 β (0,1-20ng/ml) sobre la señalización de la insulina en adipocitos murinos 3T3-F442A y 3T3-L1 diferenciados, así como en humanos. También evaluaron la expresión del gen que codifica para la IL-1 β en tejido adiposo de ratones salvajes y resistentes a la insulina <i>ob/ob</i> (inducidos por dieta y genética). | IL-1 β inhibe la fosforilación de nodos claves en la vía de señalización de insulina como; la subunidad β del receptor de insulina, de IRS-1, Akt/PKB, así como de la cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (Erk) en adipocitos murinos y humanos. |
| Stienstra <i>et al</i> ⁹⁸ | Evidenciaron la secreción de la IL-1 β en respuesta a un dieta obesogénica en ratones deficientes de Casp-1 (Casp-1 ^{-/-}). Caracterizaron la expresión y función de Casp-1 en adipocitos 3T3-L1, en el tejido adiposo de ratones Casp-1 ^{-/-} , así como en adipocitos de humanos. | A través de la inhibición de Casp-1 se disminuye el procesamiento de la IL-1 β y de esta forma, se reducen las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. |
| Wen <i>et al</i> ²⁰³ | Evaluaron el papel que tiene la IL-1 β en la resistencia a insulina en respuesta a los ácidos grasos en ratones deficientes de Nlrp3, Pvd y Casp-1. Evaluaron por medio de marcadores de proinflamatorios y parámetros metabólicos la asociación de la resistencia a la insulina con ácidos grasos. | Identificaron que la DAG induce una respuesta inflamatoria a través de elevar los niveles de la IL-1 β . Esto contribuye a la alteración en la vía de señalización de la insulina que finalmente da como resultado la resistencia a la insulina. |

| | | |
|---------------------------------------|---|---|
| Stienstra <i>et al</i> ¹⁷⁵ | Determinaron el papel central que tiene el inflammasoma Nlrp3 sobre el procesamiento de la IL-1 β . Esto derivó de los datos obtenidos en ratones deficientes de Nlrp3, ASC y Casp1 al analizar el tejido adiposo de ratones alimentados con una DAG. | La disminución de la metainflamación en la patogénesis de la obesidad correlacionó con una marcada protección contra la resistencia a insulina. |
|---------------------------------------|---|---|

Estos reportes dejan en claro que la participación de la IL-1 β es crítica para el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos. Además, esto correlaciona con la aumentada infiltración de macrófagos en el tejido adiposo debido a su expansión ocasionada por la obesidad [174]. De igual forma, se ha evidenciado que altos niveles de IL-1 β correlacionan con otras alteraciones metabólicas como lipólisis e hiperinsulinemia (HI) observadas en un estado de obesidad [116,92,94,115,202]. Dado que se han evidenciado niveles altos de IL-1 β tanto en tejidos periféricos metabólicamente activos como en el hipotálamo, así como en la circulación [204]. Se ha propuesto a la IL-1 β como un biomarcador proinflamatorio en estados de obesidad.

Con respecto a la IL-18, se sabe que al igual que la IL-1 β se sintetiza como un precursor inactivo, el cual requiere del procesamiento de la Casp-1 para su activación [164]. Luego de que la IL-18 se une a la cadena alfa de su receptor, recluta la cadena β del mismo por el que se comunica con importantes proteínas inmune reguladoras como: Myd88, ERK, JNK y NF κ B, los cuales comparte con la IL-1 [205], así como el TLR, entre otros (Tabla 2) [206].

Tabla 2. Información sobre el efecto de la IL-18 en el metabolismo.

| Autor | Condición/Efecto | Conclusión |
|---------------------------------------|---|---|
| Bruun <i>et al</i> ²⁰⁷ | Se realizó un estudio longitudinal tomando datos previos a una intervención alimentaria y después de 15 semanas con la intervención. Se compararon los niveles en plasma y tejido adiposo de la IL-18 en 23 sujetos obesos y 12 sujetos delgados. | De acuerdo con los resultados se asociaron altos niveles de IL-18 con factores de riesgo como la obesidad. |
| Fisher <i>et al</i> ²⁰⁸ | Se compararon los niveles en plasma/suero de IL-6, IL-18, TNF, CRP en 98 pacientes con DM2 y 87 controles sin DM2. De igual forma, se tomo en cuenta el Modelo de Evaluación de la Homeostasis (HOMA-IR), es una medida que sirve para evaluar la resistencia a la insulina. | Los resultados muestran que la IL-18 plasmática se asoció con un HOMA-IR positivo independientemente de la obesidad y la DM2. |
| Yi-Sheng <i>et al</i> ²⁰⁹ | Se evaluó el potencial de la IL-18 recombinante en una línea celular 3T3-L1. Esto con respecto a si la línea celular mostraría un deterioro en sobre la toma de glucosa, es decir, es el mecanismo de insulina. | Sorpresivamente, la IL-18 aumentó en lugar de reducir, la captación de glucosa mediada por insulina en los adipocitos. Esto a través del mecanismo que involucra Akt. |
| Netea <i>et al</i> ²¹⁰ | Caracterizaron en ratones deficientes de IL-18 o del receptor para IL-18 rasgos característicos del síndrome metabólico como son la obesidad, resistencia a la insulina, hiperglucemia, anomalías lipídicas y aterosclerosis. Midieron el efecto que podría tener la administración intracraneal de la IL-18 en ratones deficientes de la IL-18 sobre su consumo. | Los hallazgos indican un nuevo papel de IL-18 en la homeostasis de la ingesta energética y la sensibilidad a la insulina. |
| Yamanishi <i>et al</i> ²¹¹ | Investigaron la posible relación fisiopatológica entre la IL-18 y la dislipidemia, así como su relación con el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o la esteatohepatitis no | El estudio demostró la función crítica de IL-18 en el metabolismo de los lípidos. Ratones deficientes de la IL-18 y administrados con la |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| | alcohólica (NASH). Esto en ratones deficientes de la IL-18 y la administración de la misma vía intravenosa. | misma citocina, desarrollaron menos dislipidemias que los controles. Estos hallazgos podrían contribuir al progreso de nuevos tratamientos para NAFLD o NASH. |
| Zorrilla <i>et al</i> ²¹² | Probaron la hipótesis sobre si la IL-18 modula el aumento de peso, la ingesta de energía, el gasto energético de todo el cuerpo y la utilización de lípidos como sustrato de combustible en ratones deficientes de la IL-18 alimentados con una dieta rica en grasas. | Los resultados de la pérdida de función de IL-18 apoyan la hipótesis de que suprime el apetito y promueve el gasto de energía, así como la utilización de los lípidos como sustrato de combustible. |

La IL-18 está fuertemente asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [^{213,214}], aunque un estudio llevado por 11 años demostró que existen otras citocinas como CRP e IL-6 que podrían tener un impacto sobre el desarrollo de ECV y los niveles elevados de la IL-18, es decir, se podrían enmascarar los efectos “posiblemente“ de la IL-18, si no se toman en cuenta otros componentes [²¹⁵].

Por ultimo, algo relevante sobre la IL-18 es que, Yamanishi y colaboradores [²¹⁶], observaron que su deficiencia conduce a una desregulación en la expresión de moléculas que tienen que ver con la diferenciación de los adipocitos pardos (BA). De acuerdo con esto, tanto los BA, como el BAT expresan la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual desacopla la producción de ATP de la fosforilación oxidativa, lo que da como resultado la termogénesis en las mitocondrias de dichas células. Por lo que se tiene la hipótesis de que la IL-18 puede tener una participación en la función termogénica, lo que contribuye al gasto energético. Sin embargo, aún queda mucho por definir sobre la participación de la IL-18 y su vínculo con el metabolismo energético.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el papel de la IL-1 β e IL-18 a pesar de ser sustratos de Casp-1, podríamos decir que tienen efectos antagónicos sobre la función de los adipocitos, mas aún, sobre el metabolismo energético, pues en ausencia de alguno de ellos se podría enmascarar los efectos del otro. Así, es posible especular que diferencias en la producción de esta citocinas producidas por factores genéticos, podrían determinar la susceptibilidad a desarrollar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad [²¹⁷].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sobrepeso y la obesidad son condiciones cuyo desarrollo y mantenimiento es debido a múltiples causas, que van desde una predisposición genética, hasta el estilo de vida. Es importante destacar que estas condiciones ya no solo se sesgan a personas adultas, si no que las poblaciones mas jóvenes también están contribuyendo a incrementar las tasas de incidencia.

Si bien se están generando diversas estrategias las cuales ayudan a aminorar los efectos adversos de tener una condición de obesidad, es necesario identificar y proponer nuevos componentes que pueden tener un papel importante en prevenir alteraciones metabólicas. Dentro de los diversos componentes celulares involucrados con el metabolismo destaca la presencia de inmunomoduladores, los cuales bajo ciertas circunstancias como en la obesidad, tienen la capacidad de promover una respuesta inmune alterada la cual, como ya mencionamos tendrán efecto sobre la vía de señalización en órganos metabólicamente activos y así promover perturbaciones en el metabólicos de carbohidratos y lípidos.

En este sentido, se sabe que tanto el inflammasoma Nlrp3 como el Nlrp1 funcionan como sensores intracelulares homeostáticos, ya que al detectar algún patógeno o señal de peligro, desencadenan una cascada de señalización, y favorecen el procesamiento de diversos agentes inmunes [156]. Con respecto a la activación diferencial del inflammasoma Nlrp1b1, confiere susceptibilidad ante el estímulo con la LTx como en el caso de la cepa Balb/c, sin embargo, recordemos que esta cepa es resistente a generar obesidad y alteraciones metabólicas con una dieta alta en grasa. Mientras que la activación diferencial del inflammasoma Nlrp1b2 como es en la cepa C57BL/6J confiere resistencia al estímulo con LTx, pero esta cepa alimentada con una DAG genera obesidad y alteraciones metabólicas.

Aunado a esto, al hecho de que la eliminación de los genes Nlrp1a, Nlrp1b y Nlrp1c en el fondo C57BL/6J exacerban el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas, nos hace especular que Nlrp1 puede participar en la homeostasis de metabolismo energético [199]. Por lo que proponemos caracterizar la activación del inflammasoma Nlrp1b1 en respuesta al exceso calórico en particular con respecto a las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad en un modelo murino.

HIPÓTESIS

El inflammasoma Nlrp1b1 inhibe el proceso inflamatorio ocasionado por la obesidad, postergando el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos resultantes del consumo de una dieta alta en grasa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el inflammasoma Nlrp1b1 inhibe el proceso inflamatorio inducido en el tejido adiposo ocasionado por la ingesta de una dieta alta en grasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Evaluar si el inflammasoma Nlrp1b1 disminuye las alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa.

2.- Determinar si el inflammasoma Nlrp1b1 regula el proceso inflamatorio ocasionado por una dieta alta en grasas.

3.- Dilucidar el mecanismo mediante el cual el inflammasoma Nlrp1b1 regula el metabolismo de carbohidratos y lipídico debido a una dieta alta en grasa.

RESULTADOS

Nlrp1b1 se expresa correctamente y es funcional en ratones C57BL/6J^{Tg}.

Para determinar si el inflammasoma Nlrp1b1 contribuye a la regulación de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos resultante del exceso energético, utilizamos una línea de ratones C57BL/6J transgénicos que expresan el gen Nlrp1b1 (C57BL/6J^{Tg}). Para confirmar el funcionamiento de inflammasoma Nlrp1b1 en el fondo C57BL/6J, diferenciamos macrófagos de médula ósea de dichas cepas y los expusimos a la LTx, posteriormente evaluamos la inducción de muerte por piroptosis. De acuerdo con los resultados previamente publicados [¹⁹⁶], los macrófagos de la cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg} (susceptibles) presentaron mayor número de núcleos teñidos debido a la incorporación del yoduro de propidio (IP) en respuesta a la LTx (Figura 11A). En tanto que, en los macrófagos de ratones C57BL/6J silvestres (resistentes) la presencia de núcleos teñidos fue significativamente menor ($p < 0.001$, Figura 11A-B) independientemente de la concentración de la toxina usada.

Como confirmación del daño a la membrana inducido por la LTx, cuantificamos mayor actividad (80%) de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos de ratones Balb/c y C57BL/6J^{Tg}. Mientras que en los sobrenadantes de macrófagos de ratones silvestres los niveles de LDH fueron significativamente menores ($p < 0.001$, Figura 11C).

Dado que contamos con 2 líneas de ratones transgénicos (N12 y N13) los cuales expresan de forma heterocigota al gen Nlrp1b1. Descartamos que su expresión tuviera un efecto sobre los niveles de IL-1 β como resultado de una dosis génica diferencial por parte del transgén en ambas líneas. Por ello, mediante PCR determinamos el número de copias del transgén tanto en las líneas N12 y N13 transgénicas como en la cepa Balb/c la cual expresa de forma homocigota el gen Nlrp1b1.

No observamos que el número de copias del gen Nlrp1b1 en ambas líneas transgénicas estuviera por encima del número de copias del gen diploide Nlrp1b1 en los ratones Balb/c, es decir, la expresión de Nlrp1b1 en la cepa transgénica fue significativamente menor independientemente de la línea transgénica (Figura 12A-B). Adicionalmente, no encontramos diferencias en la activación del inflammasoma Nlrp1b1 en ambas líneas transgénicas (Figura 12C). Con respecto a la activación del inflammasoma Nlrp3/Nlrp1b1 en respuesta a LPS-ATP, observamos niveles de la enzima LDH muy similares en todas las cepas por lo que asumimos no presentan diferencias en el procesamiento de IL-1 β (Figura 12C).

En conjunto, estos datos confirman que los macrófagos de ratones que expresan el inflammasoma Nlrp1b1 responden a la LTx, adicionalmente estos presentan un tipo de muerte cuyas características

tienen que ver con piroptosis. Por otro lado, no encontramos diferencias entre las dos líneas transgénicas, por lo que a pesar de tener una sola copia del alelo *Nlrp1b1* pueden ser usados de forma indistinta para los experimentos. Por lo tanto, concluimos que los ratones C57BL/6J^{Tg} que mantenemos en el bioterio bajo nuestras condiciones expresan el inflammasoma *Nlrp1b1* de forma correcta.

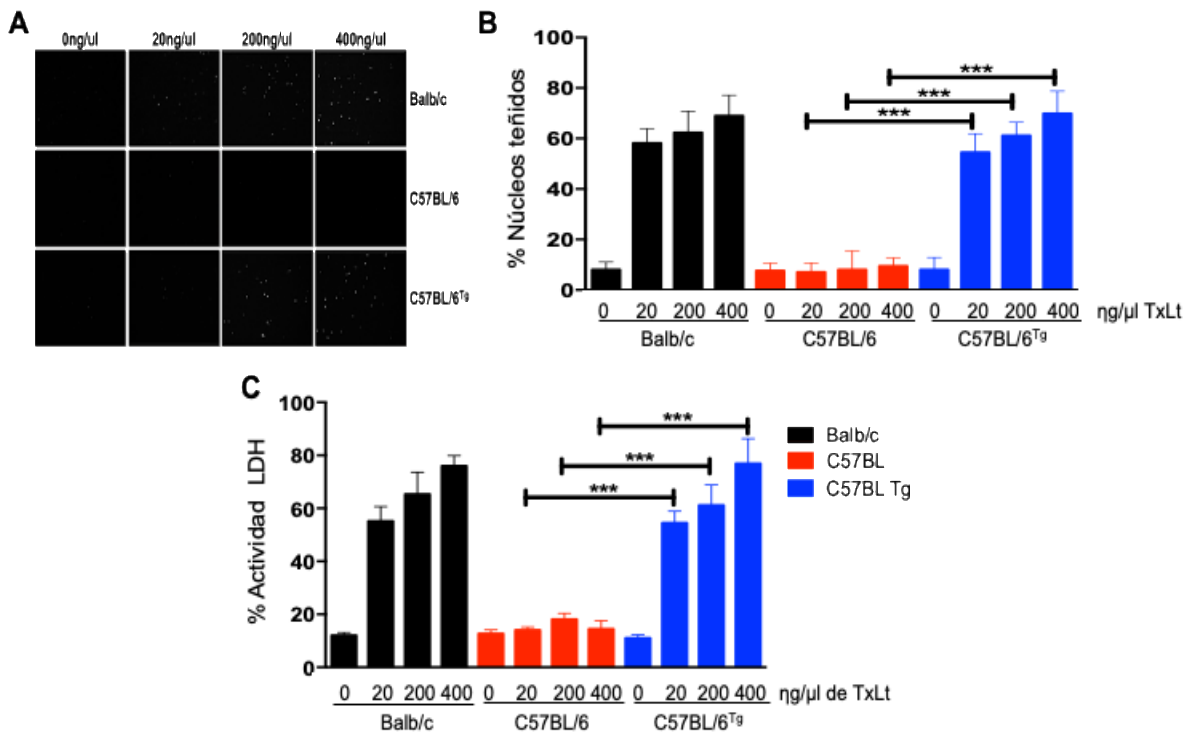


Figura 11. La expresión de Nlrp1b1 confiere susceptibilidad a la cepa C57BL/6J.

Se diferenciaron macrófagos de médula ósea de las cepas de ratones indicadas, y se expusieron en presencia de la LTx (factor letal de 20, 200 y 400 ng/ml y al antígeno protector (1 mg/ml) durante 2 horas. A) Células fijadas (PFA 4%) y teñidas con yodo de propidio (IP), observadas en microscopio de fluorescencia. B) Porcentaje de núcleos teñidos (positivos) con IP. C) Porcentaje de actividad de LDH en sobrenadantes de cultivo estimulados con LTx. Balb/c n=3, C57BL/6J n=3 y C57BL/6J^{Tg} n=3. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

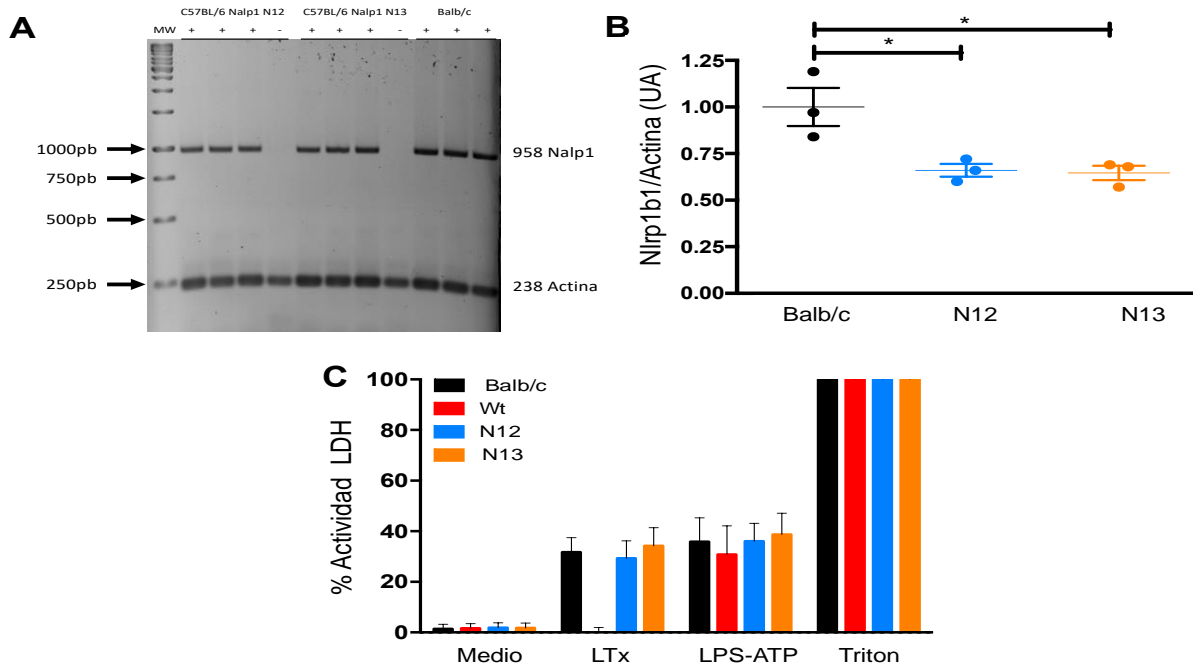


Figura 12. Dosis génica y funcionalidad del *Nlrp1b1* entre las líneas transgénicas y Balb/c.

Se extrajo DNA genómico de ambas líneas transgénicas para *Nlrp1b1* (N12 y N13), así como de ratones C57BL/6J (-) y ratones Balb/c. A) Expresión del gene *Nlrp1b1* de las diferentes cepas determinada por PCR. Los productos de DNA se resolvieron en geles de agarosa al 1%. B) Determinación de niveles de *Nlrp1b1* con base en la normalización de los niveles densitométricos de Actina. C) Unidades arbitrarias de la actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos sin estimular (medio), y estimulados con toxina letal (LTx 200ng/ml), LPS(100 ng/ml) con ATP (5mM). Balb/c n=3, C57BL/6J n=2, C57BL/6J^{Tg} N12 n=3 y N13 n=3. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

Ratones C57BL/6J^{Tg} no muestra alteraciones en el metabolismo basal de carbohidratos.

Una vez que comprobamos que la expresión del alelo *Nlrp1b1* en el fondo genético de los ratones C57BL/6J fue funcional y específico. Evaluamos si su expresión afecta el metabolismo de carbohidratos en animales alimentados con DN. Para esto, determinamos los niveles basales de glucosa, la tolerancia a la glucosa (prueba de tolerancia a glucosa, siglas en inglés; GTT) y la sensibilidad a insulina (prueba de resistencia a insulina, siglas en inglés; ITT) en las diferentes cepas de animales entre 8 y 10 semanas de edad.

De acuerdo con los resultados, los niveles basales de glucosa basal fueron similares entre los grupos de ratones C57BL/6J (155.6 mg/dL) y C57BL/6J^{Tg} (154.6 mg/dL, Figura 12A). Por otro lado, los ratones Balb/c mostraron niveles basales de glucosa significativamente bajos ($p < 0.0001$, 125.9 mg/dL, Figura 13A).

Los resultados de la prueba de GTT indican que todos los grupos de roedores son tolerantes a glucosa, ya que sus niveles de glucosa regresan a los valores basales luego de 2 horas posteriores a la administración del glúcido (Figura 13B). Si bien no hubo diferencias entre la respuesta de las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}, observamos que la cepa Balb/c si mostró valores distintos, ya que, en comparación con las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} los picos glicémicos fueron significativamente menores (Figura 13B).

En la prueba de ITT, todos los grupos de roedores mostraron una sensibilidad a la insulina similar, ya que sus niveles de glucosa bajaron en respuesta a la insulina administrada y fueron muy semejantes entre ellos (Figura 13C).

Estos datos demuestran que la expresión del alelo *Nlrp1b1* en ratones C57BL/6J, no altera el metabolismo de carbohidratos en animales jóvenes alimentados con una DN.

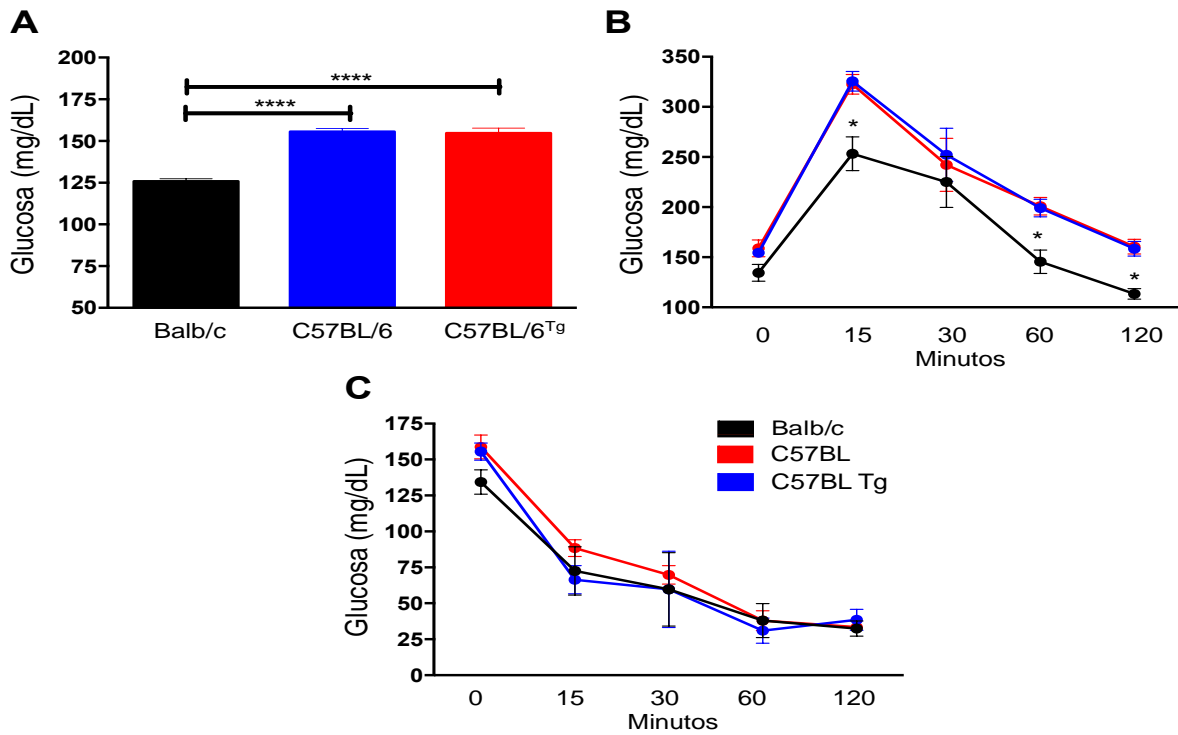


Figura 13. La expresión de Nlrp1b1 no altera el metabolismo de glucosa en ratones C57BL/6J^{Tg}.

Los animales de todas las cepas indicadas presentaron un ayuno de 6 horas previo a la prueba de GTT por lo que se inyectó intraperitonealmente 1.8 mg/gr de D-glucosa y la prueba de ITT por lo que se inyectó intraperitonealmente 1 mU/gr insulina. A) Niveles de glucosa basal. B) GTT. C) ITT. Balb/c n=10, C57BL/6J n=15 y C57BL/6J^{Tg} n=15. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Nlrp1b1 no afecta el consumo calórico ni previene la obesidad resultante del consumo de una dieta alta en grasa en ratones C57BL/6J^{Tg}.

De acuerdo con varios estudios [¹⁹⁰⁻¹⁹³], los ratones de la cepa C57BL/6J son propensos a desarrollar obesidad, y por tanto, a desarrollar alteraciones metabólicas al ser alimentados con una DAG, mientras que ratones de la cepa Balb/c son resistentes a desarrollar obesidad y alteraciones metabólicas cuando se alimentan con la misma dieta.

Por ello, evaluamos si estas diferencias fenotípicas podrían resultar de la expresión diferencial del alelo Nlrp1b1 (Balb/c, C57BL/6J^{Tg}) y del alelo Nlrp1b2 (C57BL/6J). Para esto, semanalmente y por 3 meses registramos el peso y el consumo energético de los ratones con una dieta normal (DN; 18% de grasa) o con una dieta obesogénica (DAG; 60% de grasa, Tabla 3).

Tabla 3. Información nutrimental y contenido energético de la dieta normal y dieta alta en grasa.

| TIPOS DE DIETAS | COMPOSICIÓN CALÓRICA | | | |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|--------------|---------|
| | Proteína Kcal% | Carbohidratos Kcal% | Grasas Kcal% | Kcal/gr |
| Dieta Normal (DN) | 24% | 58% | 18% | 3.1 |
| Dieta Alta en Grasa (DAG) | 20% | 20% | 60% | 5.24 |

Todos los animales alimentados con DN por 12 semanas ganaron peso, sin embargo, no observamos diferencias en la ganancia de peso entre los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} ($7g \pm 0.9$, y $7.5g \pm 0.8$ respectivamente, Figura 14A), pero con respecto a la cepa Balb/c estos ganaron significativamente menor peso ($p < 0.01$, $1.9g \pm 0.5$, Figura 14A). Esto indica que la ganancia de peso de la cepa Balb/c, es significativamente menor en comparación con las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}, aun con DN.

En cuanto al consumo de alimento DN semanal (Figura 14B-C), tampoco observamos diferencias entre los animales C57BL/6J (consumió $18.1g \pm 2.5$, lo que equivale a 55.9g Kcal) y C57BL/6J^{Tg} (consumió 18.6 ± 1.3 , 56g Kcal). Sorprendentemente, aunque ya se ha reportado [¹⁹³], a pesar de que los animales Balb/c consumieron mayor cantidad de alimento por semana ($p < 0.001$, $26g \pm 1.9$, 80.6g kcal) que los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}, como mencionamos anteriormente la cepa Balb/c registró un menor peso (Figura 14A).

En el caso de los ratones alimentados con DAG, de igual forma todas las cepas ganaron peso, nuevamente no observamos diferencias de peso entre las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} ($24.6g \pm 1.2$, y $25g \pm 1.1$ respectivamente, Figura 14A). A pesar de esto, ganaron casi tres veces más masa corporal que los ratones de la cepa Balb/c ($p < 0.001$, $8.4g \pm 1.5$, Figura 14A).

Con respecto al consumo semanal, no registraron diferencias estadísticas los animales de las cepas C57BL/6J (consumió $14g \pm 1.2$, 73.3gr Kcal) y C57BL/6J^{Tg} (consumió $14.2g \pm 2.2$ gr, 74.18.9 Kcal). Nuevamente, las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} registraron una ingesta significativamente menor en comparación con la cepa Balb/c ($p < 0.0001$, $18.1g \pm 2.3$, 94.8 Kcal, fig. Figura 14A-B), y aun así observamos un aumento significativo de peso en los ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}.

En conjunto, estos datos muestran que la expresión del alelo Nlrp1b1 en ratones C57BL/6J^{Tg} no previene la ganancia de peso inducida por el exceso calórico de una DAG. Tampoco se asoció con el hecho de que se viera alterada la ingesta de alimento, pues se registraron valores similares a entre los animales silvestres y transgénicos C57BL/6J. Los resultados sugieren que el aumento de peso pudiera ser modulado por diversos genes o mecanismos moleculares intrínsecos de cada cepa, y que el alelo Nlrp1b1 no juega un papel relevante en el control del peso corporal e ingesta de alimento.

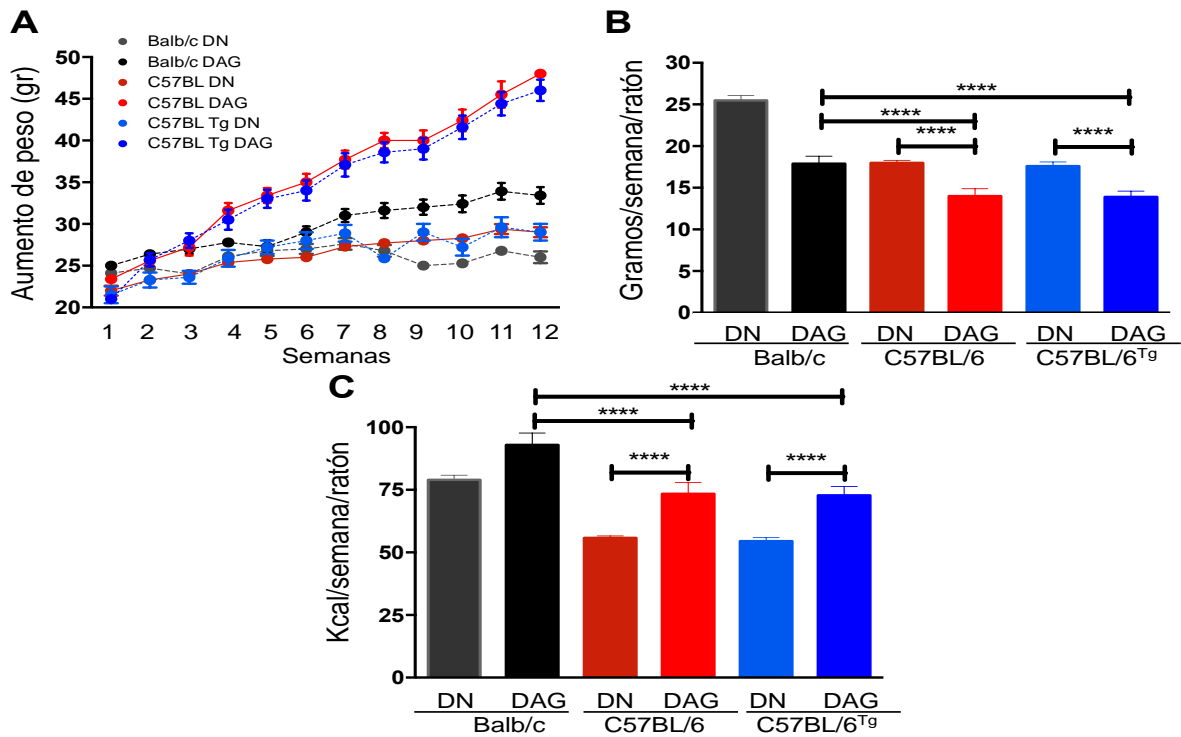


Figura 14. El gen *Nlrp1b* no afecta la ganancia de peso ni la ingesta de alimento normal o alta en grasa.

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una DN o con una DAG por tres meses y se llevo registro tanto de su peso como del consumo energético. A) Ganancia de peso semanal, monitoreado por 12 semanas. B) Consumo en gramos de alimento (DN o DAG) por ratón por semana. C) Calculo del consumo calórico por ratón por semana. Balb/c n=10, C57BL/6J n=15, y C57BL/6J^{Tg} n=15. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Nlrp1b1 atenúa la intolerancia a glucosa y resistencia a insulina en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Ya que no observamos diferencias significativas en el peso y consumo de alimento entre las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con ambas dietas, evaluamos su estado metabólico.

Para ello, determinamos los niveles de glucosa basal de los animales C57BL/6J (168.8mg/dL, Figura 15A) y C57BL/6J^{Tg} (165.6 mg/dL, Figura 15A) alimentados con DN, y no observamos diferencias estadísticas. En contraste, los animales de la cepa Balb/c mostraron niveles significativamente menores de glucosa basal ($p < 0.0001$, 138.4 mg/dL, Figura 15A).

Al someter a las 3 cepas de roedores alimentadas con DN a la prueba de GTT, todas las cepas respondieron y mostraron tolerancia a glucosa, ya que luego de la administración del glúcido, los niveles glucémicos vuelven a los niveles basales (Figura 15B). De igual manera, las mismas cepas de ratones respondieron ante la administración de insulina, durante la prueba de ITT (Figura 15C). En ambas pruebas no se observaron diferencias entre las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}.

Por otro lado, los animales de la cepa Balb/c con DN mostraron una mejor respuesta en la prueba de GTT en comparación con los animales de las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.001$), debido a que mostraron menores picos glicémicos y redujeron el glúcido rápidamente (Figura 15B). En la prueba de ITT mostraron mayor sensibilidad a la insulina, al reducir significativamente sus niveles glucémicos ($p < 0.0001$) en comparación con los animales de las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} (Figura 15C). Estos datos se confirmaron cuando se calculó el área bajo la curva (ABC) de la prueba GTT (Figura 16A), así como de la prueba ITT (Figura 16B).

Claramente, la DAG indujo un incremento en los niveles de glucosa basal en las 3 cepas de roedores, sin embargo, al compararlos contra sus contrapartes alimentados con la DN solo muestran diferencia significativa las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.01$, Figura 15A). Los animales C57BL/6J (184.5 mg/dL) y C57BL/6J^{Tg} (184.6 mg/dL) con DAG no registraron diferencias en los niveles basales de glucosa entre ellos, pero al compararlos con la cepa Balb/c fueron significativamente altos ($p < 0.0001$, 144.9 mg/dL, Figura 15A).

Curiosamente, aunque los animales C57BL/6J^{Tg} alimentados con DAG presentaron una clara intolerancia a la glucosa durante la GTT, esta fue menos pronunciada que la que presentaron los ratones C57BL/6J silvestres ($p < 0.01$, Figura 15B-Figura 16 A). En cambio, los ratones Balb/c fueron tolerantes a la glucosa y la metabolizaron sin problemas (Figura 15B-Figura 16 A).

En el caso de la prueba de ITT, los animales alimentados con DAG C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} mostraron resistencia a la insulina (Figura 15C). Sin embargo, la cepa C57BL/6J^{Tg} presentó ligeramente

una mayor sensibilidad a la insulina que los animales de la cepa silvestre ($p < 0.05$, Figura 15C). Mientras que la cepa Balb/c alimentada con DAG presentó una significativa caída en los niveles de glucosa después de la administración con la insulina, en comparación con los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.0001$, Figura 15C). De acuerdo con el cálculo del ABC, en ambas pruebas la cepa Balb/c responde significativamente mejor que las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} (Figura 16B).

Estos resultados demuestran que el metabolismo de carbohidratos de los ratones Balb/c no se altera aun cuando se alimentan con una DAG. De acuerdo a lo reportado [¹⁹⁰⁻¹⁹³] y bajo nuestras condiciones mostraron menores niveles de glucosa basal, mayor tolerancia a la glucosa, y mayor sensibilidad a la insulina.

Conforme a los resultados, observamos que los ratones C57BL/6J^{Tg} alimentados con DAG fueron menos intolerantes a la glucosa, y modestamente, más sensibles a la insulina que los ratones silvestres. En conjunto, estos datos sugieren que los animales que expresan el alelo Nlrp1b1 atenúan las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos asociadas con una DAG por 3 meses.

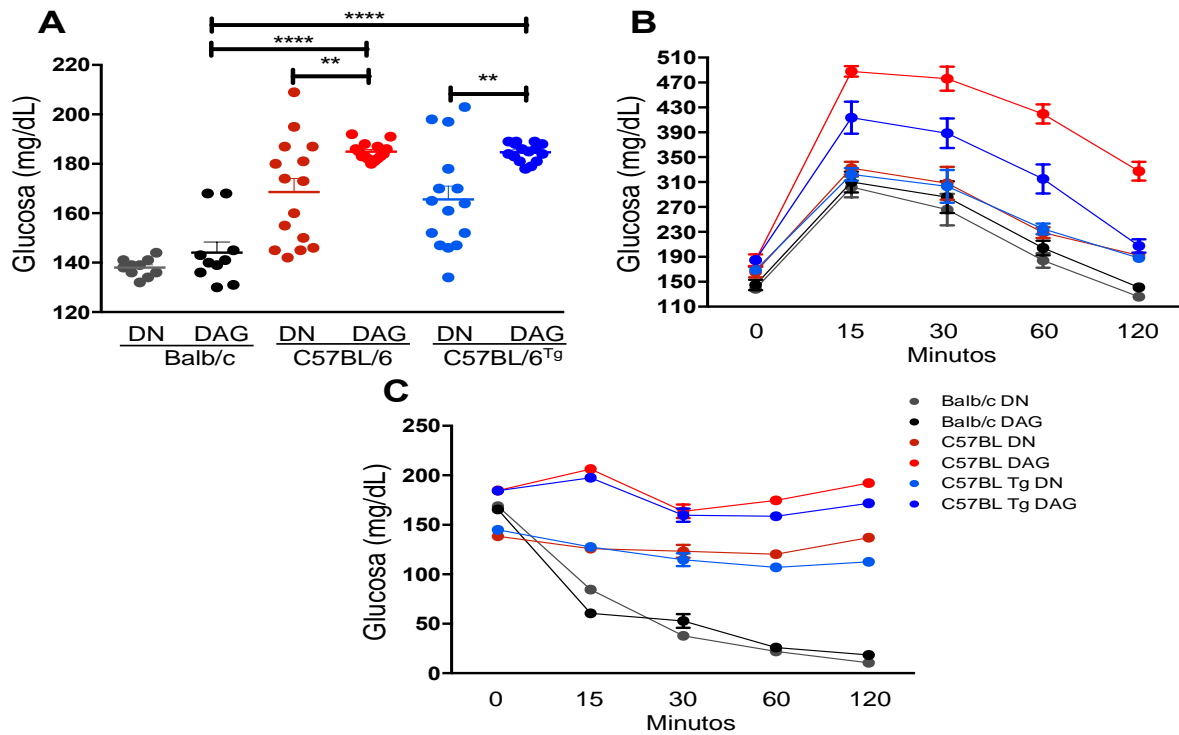


Figura 15. El gen *Nlrp1b1* regula el metabolismo de carbohidratos posterior a 3 meses con una DAG.

Los animales de todas las cepas indicadas presentaron un ayuno de 6 horas previo a la prueba de GTT, posteriormente se les inyectó intraperitonealmente D-glucosa. Para la prueba de ITT también se les puso en ayuno de 6 y posteriormente se les inyectó intraperitonealmente insulina. A) Niveles de glucosa basal. B) GTT intraperitoneal (1.8 mg/gr de D-glucosa). C) ITT intraperitoneal (1 mU/gr insulina). Balb/c n=10, C57BL/6J n=15 y C57BL/6J^{Tg} n=15. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

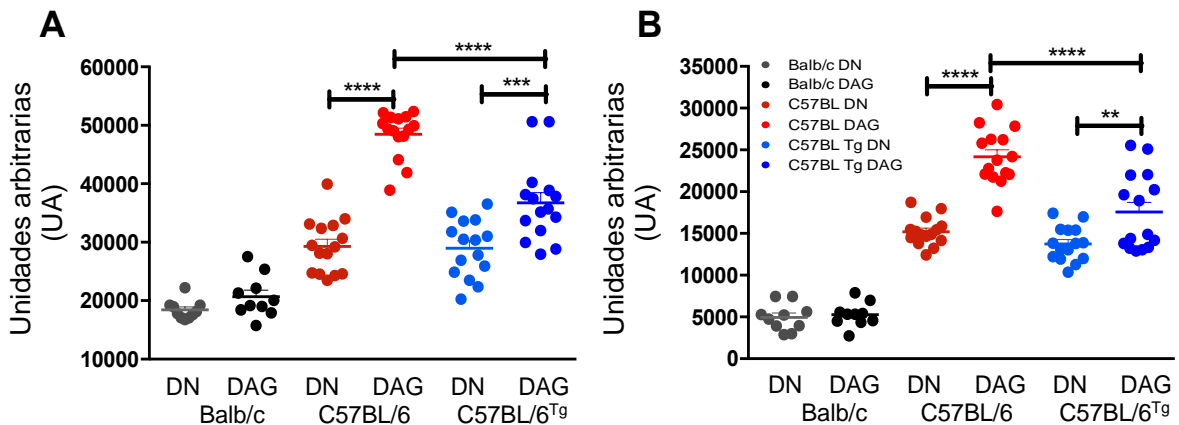


Figura 16. Cuantificación global de la respuesta metabólica producida por una dieta DAG.

Los animales de todas las cepas indicadas presentaron un ayuno de 6 horas previo a la prueba de GTT, posteriormente se les inyectó intraperitonealmente 1.8 mg/gr de D-glucosa. Para la prueba de ITT también se les puso en ayuno de 6 y posteriormente se les inyectó intraperitonealmente 1 mU/gr insulina. A) Cuantificación global de la respuesta al bolo con glucosa (Área Bajo la Curva; AUC) de la prueba de GTT. B) Cuantificación global de la respuesta al bolo con insulina (Área Bajo la Curva; AUC) de la prueba de ITT. Balb/c n=10, C57BL/6J n=15 y C57BL/6J^{Tg} n=15. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Nlrp1b1 modula la secreción de la sensibilidad a la insulina en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Es probable que las diferencia en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a insulina entre los ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} se deban a diferencias en la secreción de la insulina. De igual forma, la vía de señalización de la insulina en el tejido hepático y/o músculo pueden mostrar variaciones como consecuencia a la ingesta de una DAG.

Para comprobar esto, evaluamos los niveles de insulina tanto basal como la secretada 15 minutos después de una inyección intraperitoneal con glucosa. De acuerdo a los resultados, los animales C57BL/6J (2.3ng/ml) y C57BL/6J^{Tg} (1.9ng/ml) alimentados con DN, no mostraron niveles de insulina diferentes entre sí (Figura 17A). Al compararlos con los niveles de insulina post inyección de glucosa, observamos un aumento en los niveles de insulina nuevamente similar entre ellos, (C57BL/6J; 3.9ng/ml, C57BL/6J^{Tg}; 3.5ng/ml, Figura 17B).

Con respecto a la cepa Balb/c alimentada con DN, sorprendentemente los niveles de insulina basal (1.2ng/ml) no fueron tan diferentes a los niveles post glucosa (1.4ng/ml, Figura 17A-B). De igual manera, tampoco observamos diferencias al compararlos con los niveles basales de las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DN (Figura 17A). Sin embargo, al compararlos con los niveles post glucosa observamos un aumento significativo en las en las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con respecto a la cepa Balb/c ($p < 0.001$, Figura 17B).

Por otro lado, al comparar los niveles basales de insulina en los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con DAG, es claro que debido a la naturaleza de la dieta obesogénica, estos mostraron valores significativamente altos de insulina en comparación con los valores de los animales con DN ($p < 0.001$, Figura 17A). De manera interesante, los ratones C57BL/6J^{Tg} presentaron niveles de insulina basal (3.8ng/ml) significativamente bajos en comparación con la cepa silvestre (6.3ng/ml, $p < 0.0001$; Figura 17A). Más aun, al comparar los niveles de insulina luego de la inyección con el glúcido, observamos que los niveles de insulina en los ratones C57BL/6J^{Tg} continuaron significativamente bajos (7.7ng/ml) en comparación con los de la cepa silvestre ($p < 0.05$, 10ng/ml, Figura 17B).

Con respecto a los niveles de insulina basal (2.1ng/ml) y post glucosa (5.9 ng/ml) de la cepa Balb/c alimentada con DAG, se observa un incremento significativo ($p < 0.01$, Figura 17A-B). Sin embargo, los niveles de insulina tanto basal como post glucosa, en los ratones Balb/c alimentados con DAG fueron significativamente bajos en comparación con los niveles de los ratones C57BL/6J ($p < 0.0001$) y C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.01$) alimentados con DAG (Figura 17).

Estos datos en conjunto nos indican que, bajo un régimen de DN no se ve alterada la secreción de insulina en los ratones que expresan el alelo *Nlrp1b1*, y ante el estímulo con glucosa, como es de esperarse observamos un aumento en los niveles de esta. Si bien observamos que, en el caso de animales C57BL/6J^{Tg} obesos los niveles de insulina basal están aumentados con respecto a los alimentados con DN, estos fueron significativamente bajos en comparación con los niveles de insulina de ratones silvestres obesos. Tras el estímulo con glucosa, los niveles de insulina se elevan, pero se mantienen significativamente bajos en comparación con la cepa silvestre. Esto confirma que, los ratones C57BL/6J silvestres alimentados con una DAG muestran hiperinsulinemia (HI).

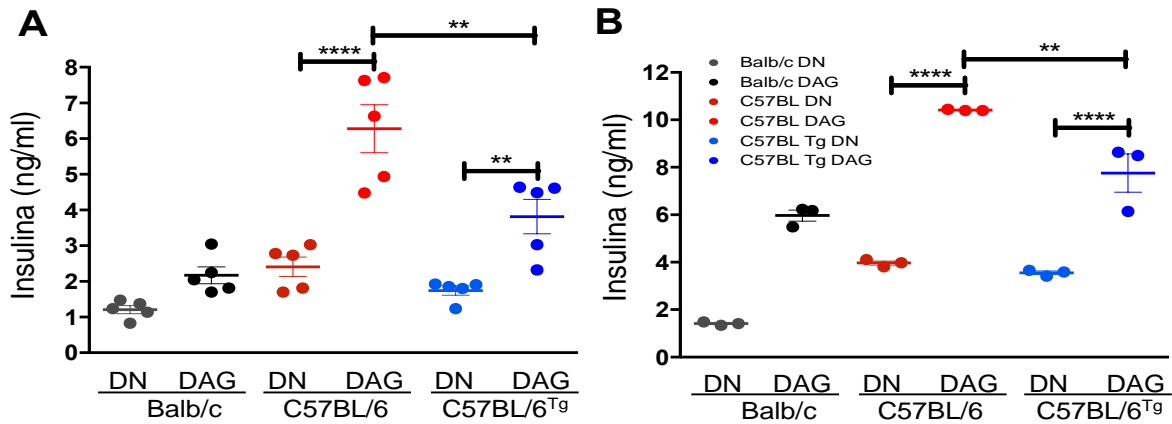


Figura 17. El gen *Nlrp1b1* regula la secreción de insulina posterior a 3 meses con una DAG.

Los animales de todas las cepas indicadas presentaron un ayuno de 6 horas previo, posteriormente se inyectó intraperitonealmente 1.8 mg/gr de D-glucosa, y fueron sacrificados 15 min después. Se les extrajo sangre para poder obtener suero a todos los ratones. A) Cuantificación de insulina basal. B) Cuantificación de insulina luego de administrar un bolo con glucosa intraperitonealmente (1.8 mg/gr de D-glucosa). Balb/c n=6, C57BL/6J n=7 y C57BL/6J^{Tg} n=7. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***) y p < 0.0001 (****).

Nlrp1b1 aumenta la sensibilidad a la insulina en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

De acuerdo a lo anterior, los ratones C57BL/6J^{Tg} obesos secretan menores niveles de insulina con o sin estímulo de glucosa en comparación con los C57BL/6J obesos, y adicionalmente, sostienen una mejor sensibilidad a la insulina (Figura 15B-C y Figura 16A-B). En tanto que, los ratones silvestres obesos a pesar de registrar mayores niveles de insulina, no logran controlar los niveles de glucosa por lo que son considerados resistentes a la insulina (Figura 15B-C y Figura 16A-B).

Para confirmar que los animales C57BL/6J^{Tg} obesos muestran una mayor sensibilidad a la insulina en comparación con los ratones C57BL/6J obesos. Evaluamos la activación de la cinasa Akt con la fosforilación en la serina 473 (pAKT^{S473}) por western blot en el músculo e hígado de forma basal y al ser estimulados con insulina exógena.

De acuerdo con los resultados, observamos que los animales C57BL/6J^{Tg} obesos mostraron mayores niveles de fosforilación de pAKT^{S473} tanto en el músculo ($p < 0.001$, Figura 18A), como en el hígado ($p < 0.05$, Figura 18B) en comparación con los animales C57BL/6J obesos.

En conjunto estos datos sugieren, que los animales que expresan el alelo Nlrp1b1 regulan la secreción de la insulina a pesar de haber sido alimentados con una dieta obesogénica por 12 semanas. Adicionalmente, presentan una mayor activación de la cinasa Akt en órganos metabólicamente activos lo que los ayuda a mantener una sensibilidad a insulina.

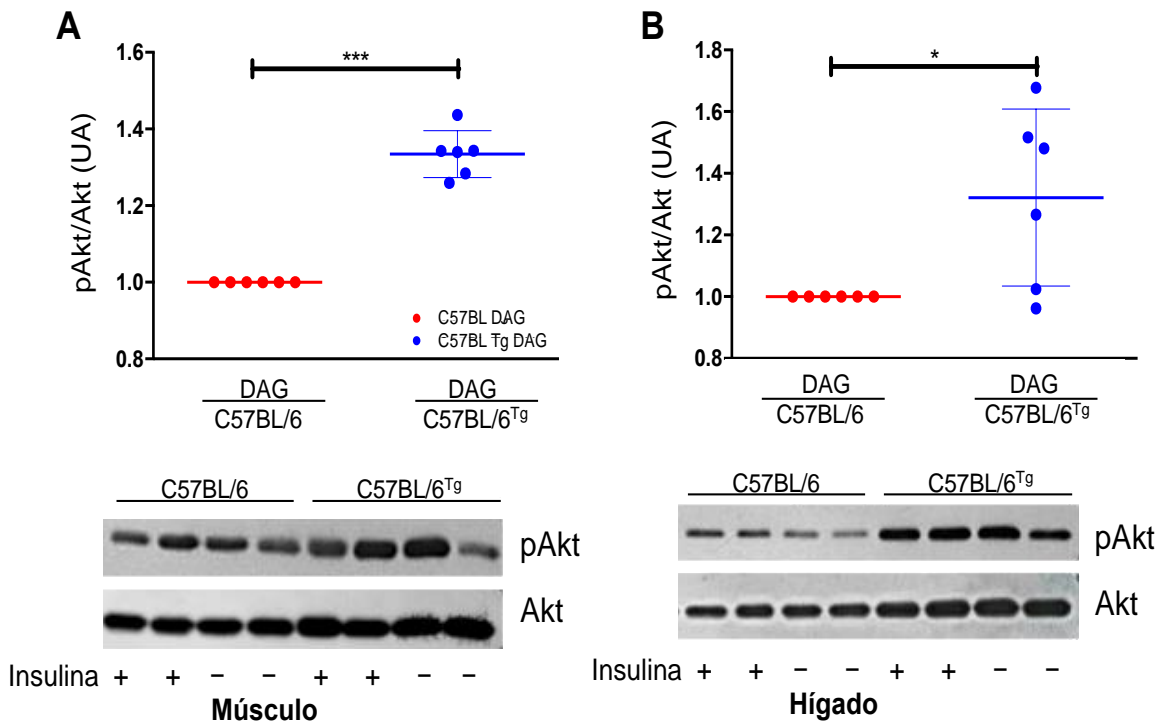


Figura 18. La presencia de Nlrp1b1 mejora la sensibilidad a insulina en ratones C57BL/6J obesos.

Animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con DAG se les indujo un ayuno de 6 horas, posteriormente se les inyectó intraperitonealmente insulina (1 mU/gr insulina), y se procedió a su sacrificio 15min después de la inyección. Se les extrajo tejido muscular y hepático para realizar los western blots correspondientes. A) Cuantificación densitométrica de los niveles de pAkt^{S473} en músculo. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de pAkt^{S473} en hígado. Se normalizaron los valores del grupo de ratones C57BL/6J a 1 para observar diferencias en los niveles de ratones C57BL/6J^{Tg}. Se utilizó AKT como control de carga. Los ratones fueron divididos en dos grupos: sin tratamiento (-) y con una inyección de 1mU/gr de insulina (+). C57BL/6J n=6, C57BL/6J^{Tg} n=6. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

Los ratones C57BL/6J^{Tg} obesos no son resistentes a leptina.

Otra hormona relacionada con la obesidad es la leptina. Dado que su función principal es inhibir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto energético, se ha discutido que en un estado de obesidad también existe resistencia a leptina al igual que con la insulina [218]. Por ello, determinamos los niveles de leptina en las diferentes cepas de animales alimentados con ambas dietas.

De acuerdo con los resultados, observamos que los animales C57BL/6J^{Tg} con DN (2.5ng/ml, Figura 19A) mostraron niveles de leptina significativamente bajos en comparación con animales C57BL/6J con DN ($p < 0.05$, 4.8ng/ml, Figura 19A). Con respecto a los animales alimentados con DAG, estas diferencias se incrementaron casi 3 veces más, pues los animales C57BL/6J^{Tg} (13.7ng/ml, Figura 19A) siguieron manteniendo niveles bajos de leptina en comparación con los animales C57BL/6J ($p < 0.05$, 55.3ng/ml, Figura 19A).

Con respecto a la cepa Balb/c, los niveles de leptina fueron significativamente bajos independientemente de la dieta y en comparación con el resto de las cepas de ratones ($p < 0.001$, DN; 0.5ng/ml, $p < 0.0001$, DAG; 0.8ng/ml, Figura 19A).

De manera interesante, al graficar la ingesta de alimento durante las 12 semanas (Figura 19B), observamos que los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DN no presentan variaciones en el patrón de consumo, y en la semana 10 observamos que ambas cepas presentan una ligera caída de su ingesta (Figura 19B). Con respecto a las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DAG tampoco se observa una diferencia en el patrón de consumo, pero, observamos una disminución en el consumo a partir de la semana 3 en ambas cepas, y en el caso de la cepa C57BL/6J^{Tg} se observa una caída significativa de la ingesta en la semana 7 la cual se mantiene hasta su sacrificio a la semana 12 ($p < 0.05$). Mientras que la cepa C57BL/6J incrementa su ingesta en la semana 9 y se mantiene por arriba de la cepa transgénica hasta su sacrificio a la semana 12 (Figura 19B).

Con respecto a la cepa Balb/c, se observan claras diferencias en el patrón de consumo entre los DN y DAG. Pues los animales con DN mostraron un significativo aumento del consumo en comparación con los DAG ($p < 0.0001$, Figura 19B). Pero a pesar de esto, no se ve reflejado en su peso en comparación con ninguna otra cepa.

La homeostasis de la glucosa está estrechamente regulada no solo por la insulina, sino también por la leptina. Dado que, observamos menores niveles de insulina en los animales transgénicos, es probable que esto se vea reflejado también en los bajos niveles de leptina como observamos. Si bien, los animales que expresan el alelo Nlrp1b1 mantienen niveles bajos de leptina, observamos que a través del

tiempo tienden a mostrar una ligera caída en el patrón de consumo. Sin embargo, en el caso de los transgénicos esto no impidió que ganaran el mismo peso que los animales silvestres.

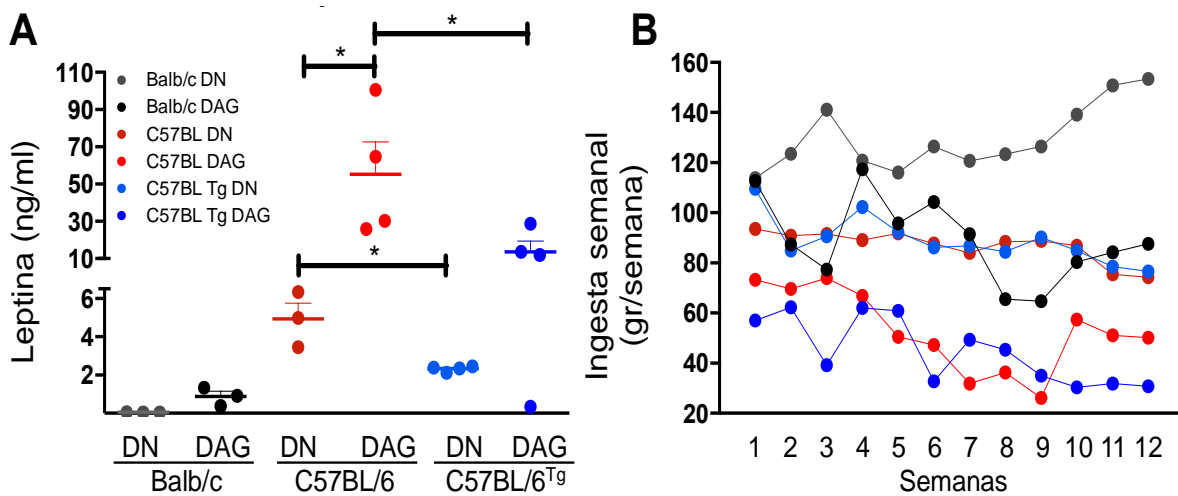


Figura 19. Ratones C57BL/6J obesos mas sensibles a leptina.

Registramos el patrón del consumo de los animales semanal. Luego de 6 horas de ayuno se sacrificaron los animales y se extrajo sangre para poder obtener suero y medir los niveles de leptina. A) Cuantificación de leptina. Balb/c n=6, C57BL/6J n=7 y C57BL/6J^{Tg} n=7. B) Cuantificación semanal del consumo total de alimento a lo largo de 12 semanas. Balb/c n=10, C57BL/6J n=15 y C57BL/6J^{Tg} n=15. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

Nlrp1b1 disminuye el proceso inflamatorio en el tejido adiposo de animales obesos.

Debido a que observamos una mejora en el metabolismo de carbohidratos, así como menores niveles tanto de insulina como de leptina en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos. Se sabe que un probable causas de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos pueden deberse como consecuencia por los altos niveles de leptina la cual puede promover un estado inflamatorio en el tejido adiposo [219]. Por lo que, decidimos realizar un análisis histológico de este tejido teñido con hematoxilina eosina (H&E) en las 3 cepas de ratones alimentadas con ambas dietas, y con ello, identificar células inmunes infiltradas como ya se ha reportado [78].

Lo primero que nos llamo la atención, fue el comparar la estructura de los adipocitos de las cepas alimentadas con dieta DN, pues observamos que en la cepa Balb/c destaca un mayor número de adipocitos por área total de la histografía, por lo cual intuimos se trata de hiperplasia (Figura 20A). Mientras que en las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}, se observó que los adipocitos fueron ligeramente de mayor tamaño (hipertrofia) en comparación con la cepa Balb/c (Figura 20A). Sin embargo, no observamos diferencias en el tamaño o número de adipocitos entre los animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} (datos no mostrados).

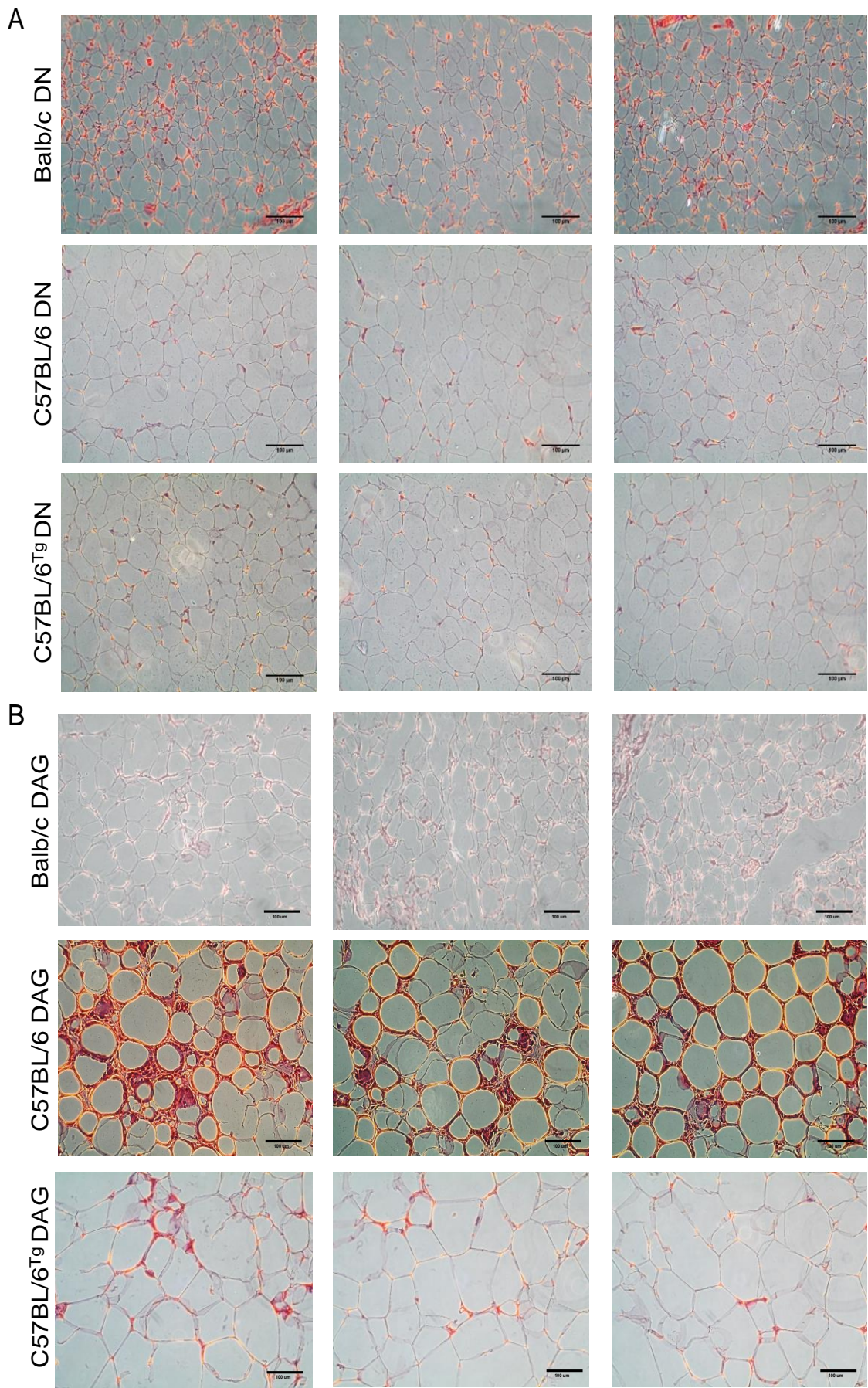
Con respecto a los animales alimentados con una DAG, observamos un claro aumento en el tamaño de los adipocitos en comparación con su contraparte alimentada con una DN (Figura 20B-C). Curiosamente, se observa una similitud en cuanto a la estructura de los adipocitos entre las cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg}, pero el tamaño de los adipocitos es mayor en la cepa transgénica. Mientras que la cepa C57BL/6J muestra mayor heterogeneidad tanto en el tamaño, como posiblemente el número de adipocitos (Figura 20B-C).

En relación a las diferencias en la estructura presentada en las cepas alimentadas con una DAG, se sabe que la infiltración de células inmunes en el tejido adiposo tienen una participación muy importante tanto en el remodelamiento del tejido como en la homeostasis [220]. Por ello, determinamos el porcentaje del área de infiltración, así como el número de células infiltrantes en el tejido adiposo retroperitoneal (Figura 21). El análisis se realizó con base a la cuantificación de áreas mayormente teñidas con H&E de las histografías, y por medio de esto, constatamos que el área de infiltración que presentan las cepas C57BL/6J (5.7%) y C57BL/6J^{Tg} (5.6%) con DN era similar entre ellas, y no presentan diferencia contra la cepa Balb/c (3.1%, Figura 21A).

En el caso de los animales alimentados con la DAG, observamos que los ratones C57BL/6J (22.3%) tuvieron un incremento significativo en el porcentaje de infiltración y de tres veces mayor, en comparación con la cepa C57BL/6J^{Tg} (7.1%) y Balb/c (7.5%, $p < 0.001$, Figura 21A).

Por consiguiente, la cuantificación de células infiltrantes observadas en los animales con DN para el caso de Balb/c (4.8 células/mm²), C57BL/6J (5.3 células/mm²), y C57BL/6J^{Tg} (5.3 células/mm²) fue muy similar como habíamos observado (Figura 21B). Mientras que en los animales con DAG, la cuantificación observada en el caso de Balb/c (5.7 células/mm²) fue significativamente menor en comparación con la cepa C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.001$, 22.6 células/mm²). Sin embargo, la cepa C57BL/6J (62 células/mm²) presentó casi tres veces más infiltración en comparación con la cepa transgénica ($p < 0.0001$), y la cepa Balb/c ($p < 0.0001$, Figura 21B).

Estos datos demuestran que las cepas que expresan al alelo Nlrp1b, a pesar de haber sido alimentadas con la DAG, presentan menor infiltración de células inmunes en su tejido adiposo. Esto sugiere que el inflammasoma Nlrp1b1 atenúa la quimiotaxis de células inmunes locales en el tejido adiposo de animales obesos resultante de una DAG.



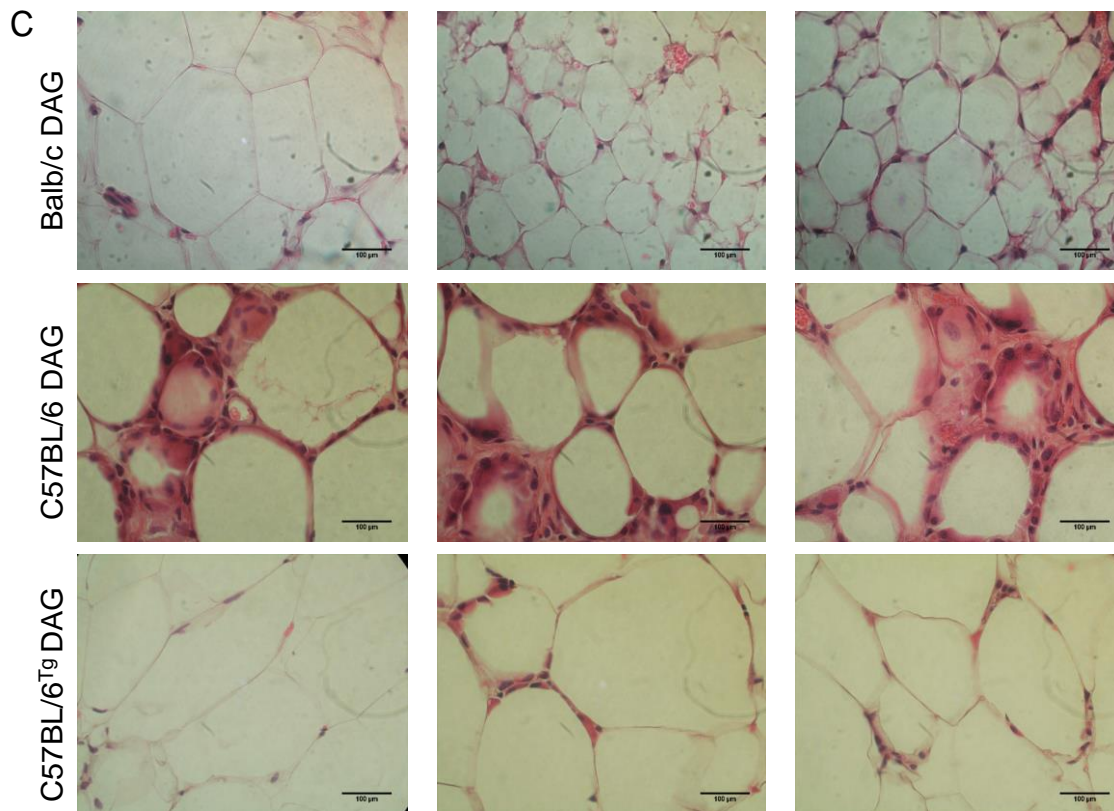


Figura 20. La expresión del alelo Nlrp1b1 disminuye el infiltrado de células inmunes en tejido adiposo retroperitoneal de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Luego del sacrificio se obtuvo tejido adiposo retroperitoneal y se procesó para su tinción con hematoxilina eosina para su análisis. A) Micrografías de tejido adiposo de 3 ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DN (20x). B) Micrografías de tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DAG (20x). C) Micrografías de tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DN (63x). Prueba estadística realizada ANOVA. La barra en las micrografías representa 100μm. Balb/c n=3 C57BL/6J n=3, C57BL/6J^{Tg} n=3, tomando 10 fotos por ratón. Micrografías obtenidas por microscopía confocal invertido, objetivo 20x y 63x.

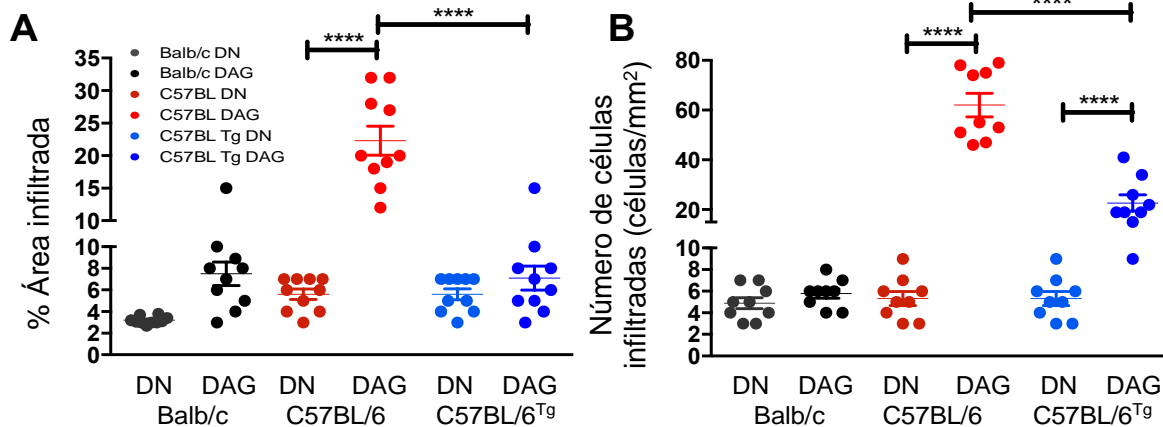


Figura 21. La expresión del alelo Nlrp1b1 disminuye el número de células inmunes en tejido adiposo retroperitoneal de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Por medio de las laminillas de tejido adiposo retroperitoneal teñido con hematoxilina eosina se realizó la cuantificación del infiltrado celular. A) Cuantificación de área de infiltrado (daño) de células inmunes en tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con DN y DAG. B) Cuantificación de células inmunes en el tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} con dieta DN y DAG. El análisis de área y conteo del número de células se realizó por medio de software Imagej. C57BL/6J n=3, C57BL/6J^{Tg} n=3, tomando 10 fotos por ratón. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***) y p < 0.0001 (****).

Nlrp1b1 regula el perfil proinflamatorio en el tejido adiposo de animales obesos.

Dado que observamos una menor infiltración celular en el tejido adiposo de animales transgénicos obesos. Decidimos identificar el fenotipo celular al que pertenecen y con ello, establecer el papel que pudieran tener la expresión del alelo Nlrp1 en la infiltración celular bajo una alimentación obesogénica (Figura 22).

De acuerdo con los resultados, cuantificamos e identificamos que el infiltrado celular en el tejido adiposo en el caso de los ratones C57BL/6J^{Tg} alimentados con DAG fue significativamente menor y corresponde a neutrófilos debido al marcador Ly6G que presentan ($p < 0.001$, Figura 22A), también a macrófagos de acuerdo con el marcador F4/80 ($p < 0.01$, Figura 22A) y en contraste, observamos un aumento significativo en el número de células Treg de acuerdo con el marcador FoxP3⁺ ($p < 0.01$, Figura 22A) en comparación con los ratones C57BL/6J obesos.

Estos resultados se asociaron con el hecho de que en el tejido adiposo de los ratones C57BL/6J^{Tg} obesos, se observaran niveles reducidos de quimiocinas involucradas en la migración de neutrófilos y macrófagos como CCL-11, GM-CSF, CXCL9,11,12 ($p < 0.05$, Figura 23A-B). Pero niveles aumentados de CCL-1 y CCL-5 implicados en la quimiotaxis de células Treg ($p < 0.05$), en comparación con los niveles encontrados en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J obesos que fueron contrarios (Figura 23A-B).

Cabe destacar, que en el tejido adiposo de los animales C57BL/6J obesos también observamos mayor expresión de algunas citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6, y TNF ($p < 0.05$), y como esperábamos de leptina ($p < 0.05$). Mientras que citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 se encontraban significativamente disminuidas ($p < 0.05$), y en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos aumentadas (Figura 23B).

Juntos estos datos, indican que el alelo Nlrp1b1 redujo el proceso inflamatorio en el tejido adiposo resultante de la dieta DAG. Además, contribuye a que en el tejido adiposo de ratones transgénicos obesos se aumenten las células Treg, lo que sugiere que en este tejido predomine un ambiente antiinflamatorio.

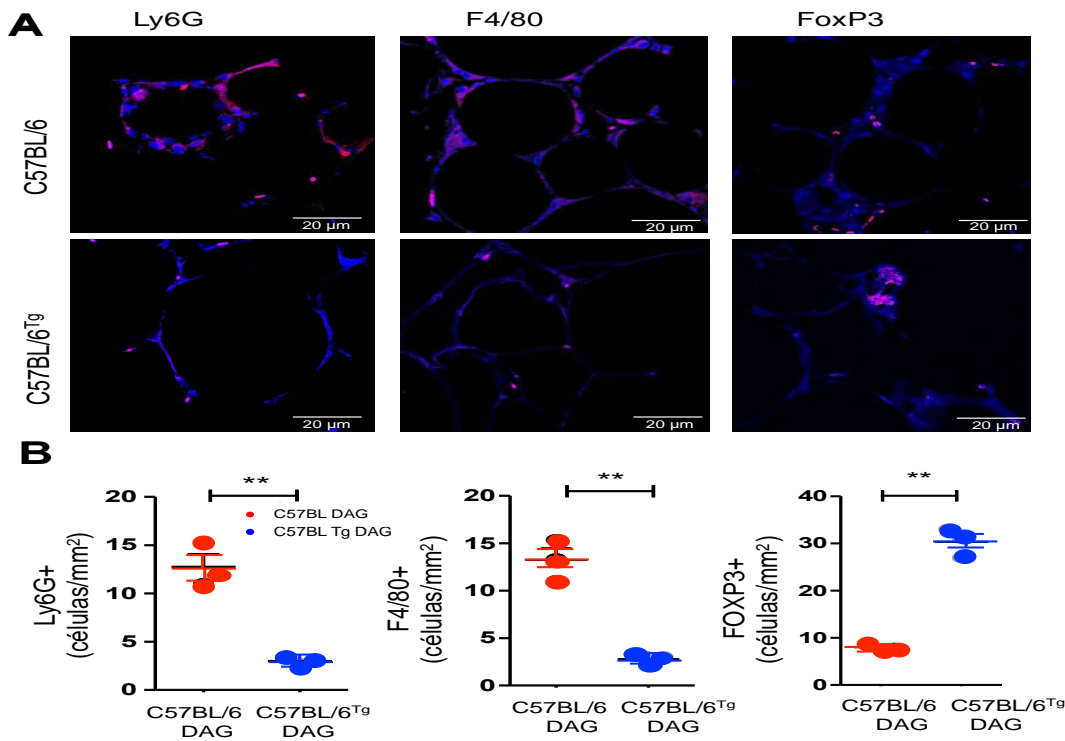


Figura 22. Nlrp1b1 atenúa las células proinflamatorias en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Inmunohistoquímica del tejido adiposo retroperitoneal de ratones alimentados con DAG para caracterizar el infiltrado celular. A) Inmunohistoquímica de Ly6G⁺, F4/80⁺ y F0XP3⁺. B) Cuantificación del área positiva a los diferentes marcadores celulares. La barra en las micrografías representa 20µm. C57BL/6J n=3, C57BL/6J^{Tg} n=3. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

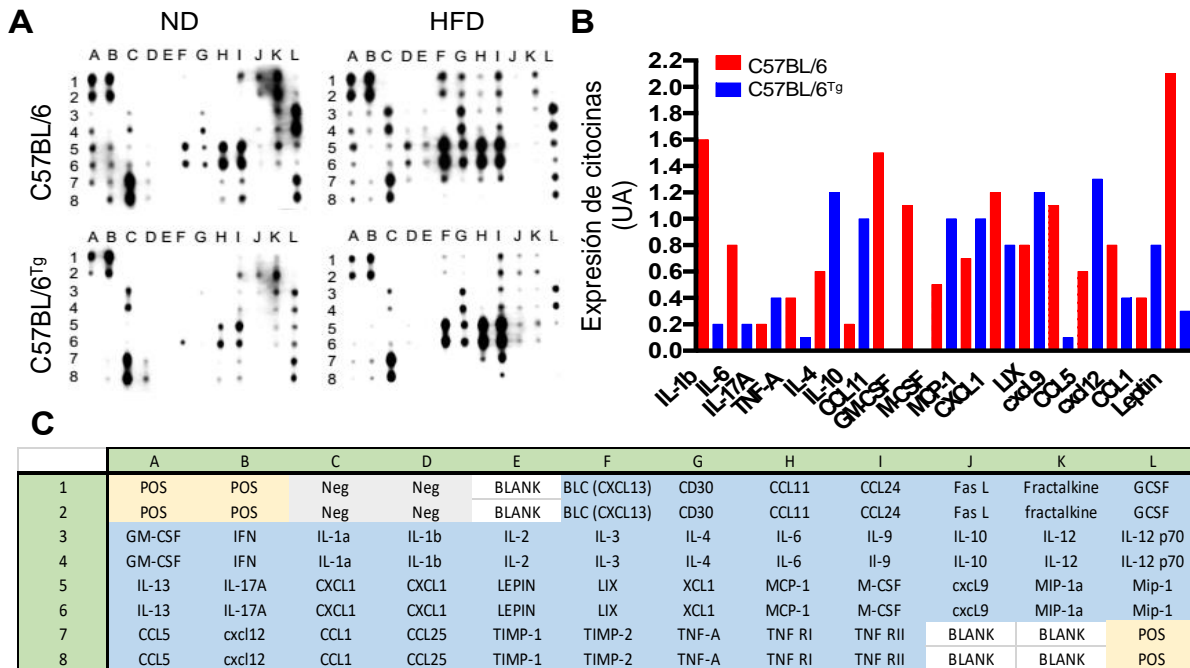


Figura 23. Nlrp1b1 disminuye el proceso inflamatorio en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

A partir de extractos proteicos obtenidos del tejido adiposo de ratones alimentado con una DN y DAG, se obtuvo el perfil de expresión de citocinas y quimiocinas. A) Membranas incubadas con los extractos para evaluar los niveles de citocinas y quimiocinas. B) Cuantificación de los niveles de citocinas y quimiocinas en el tejido adiposo. Los valores de densitometría representan la expresión total comparando 1 animal con DAG contra su contraparte DN (normalizados). C) Tabla del perfil de citocinas. Prueba estadística realizada T de student. C57BL/6J n=2, C57BL/6J^{Tg} n=2.

Nlrp1b1 atenúa el procesamiento de Casp-1 e IL-1 β .

Dado que evidenciamos que en el tejido adiposo de ratones transgénicos obesos disminuyeron las poblaciones celulares inmunes con fenotipo proinflamatorio y predominaba un perfil antiinflamatorio. Evaluamos los niveles de activación de la Caspasa-1 (Casp-1, cisteínproteasa activada por los inflamomas Nlrp1 y Nlrp3), así como la producción de la IL-1 β (citocina procesada por Casp-1). Esto debido a que ambas citocinas están relacionadas en las alteraciones metabólicas asociados a la obesidad.

De acuerdo con los resultados, observamos que en el tejido adiposo tanto de animales C57BL/6J como C57BL/6J^{Tg} alimentados con DN, mostraban muy poca o nula presencia de la Casp-1 activa (Figura 24A). Con respecto a los animales alimentados con DAG, fue claro que la cepa C57BL/6J^{Tg} también mostro casi nulo procesamiento de la Casp-1, mientras que la C57BL/6J mostro niveles elevados de Casp-1 activa (Figura 24A).

Adicionalmente, observamos que los niveles de la IL-1 β madura, fueron nulos en el tejido adiposo de animales C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con DN (Figura 24B). Nuevamente, en los animales alimentados con una dieta obesogénica observamos que la cepa C57BL/6J^{Tg} presentó muy poco o casi nulos niveles de la IL-1 β madura, contrario en la cepa C57BL/6J que presentó incrementados niveles de la IL-1 β madura (Figura 24B).

Estos resultados concordaron con el hecho de que en el suero de ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con DN se cuantificaran niveles bajos de IL-1 β y sin diferencia entre ellos (Figura 24B). Por otro lado, los ratones C57BL/6J^{Tg} obesos mostraron niveles reducidos de esta citocina proinflamatoria, en comparación con los ratones C57BL/6J obesos los cuales mostraron niveles significativamente altos de IL-1 β circulante ($p < 0.05$, Figura 24C). Mientras que, los ratones Balb/c no mostraron diferencias en los niveles de IL-1 β entre ellos independientemente de la dieta (Figura 24C). Cabe mencionar, que los valores de IL-1 β de la cepa C57BL/6J^{Tg} fueron muy similares a los valores de la cepa Balb/c.

Dado que observamos bajos niveles de casp-1 activa y de IL1b madura en el tejido adiposo de la cepa transgénica, descartamos que esto se debiera a defectos en la activación del inflamoma Nlrp3 en respuesta a agentes proinflamatorios presentes en una condición de obesidad (Figura 25).

Las diferencias observadas en los niveles de IL-1 β en los ratones C57BL/6J^{Tg}, no se debieron a efectos negativos de Nlrp1b1 sobre la activación del inflamoma Nlrp3. Ya que, al someter a los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} a los diversos estímulos como LPS-ATP (Figura 25A), glucosa (Figura 25B), o ácido palmítico (Figura 25C), no encontramos

diferencias en los niveles de IL-1 β secretada al medio del cultivo entre ambas cepas. Más aun, el inflammasoma Nlrp1b1, fue activó solo en macrófagos derivados de médula ósea de ratones transgénicos tras la exposición a la LTx (Figura 25D).

Estos datos demuestran que, tanto en tejido adiposo como en circulación, los animales con el alelo Nlrp1b1 mantienen niveles bajos tanto del zimógeno de Casp-1 e IL-1 β aun con una dieta obesogénica. Esto es congruente con el hecho de que hayamos visto un perfil menos inflamatorio en los animales C57BL/6J^{Tg}. Juntos estos resultados indican que el alelo Nlrp1b1 redujo el proceso inflamatorio resultante de una DAG en el tejido adiposo independiente al inflammasoma Nlrp3.

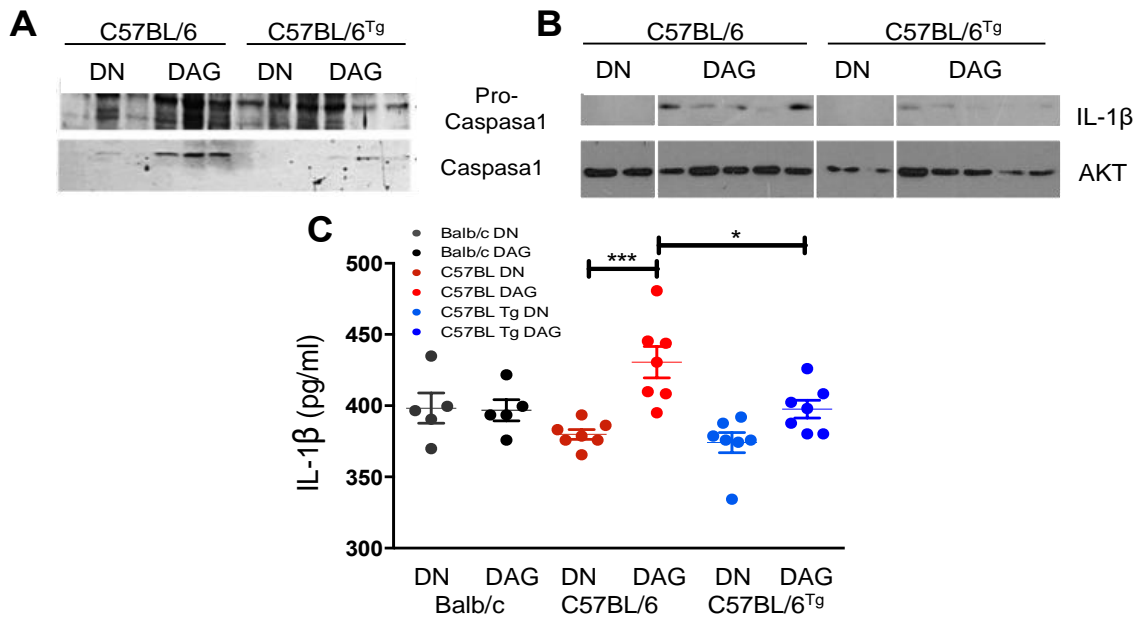


Figura 24. Nlrp1b1 disminuye la inflamación en el tejido adiposo en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Luego del sacrificio se obtuvo tejido adiposo retroperitoneal y suero para el análisis de Casp-1 e IL-1 β de ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con ambas dietas. A) WB de pro Casp1 y Casp1 en tejido adiposo. B) WB de IL-1β en tejido adiposo. C) Cuantificación de los niveles de IL-1β en suero. Balb/c n=6 C57BL/6J n=6, C57BL/6J^{Tg} n=6. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

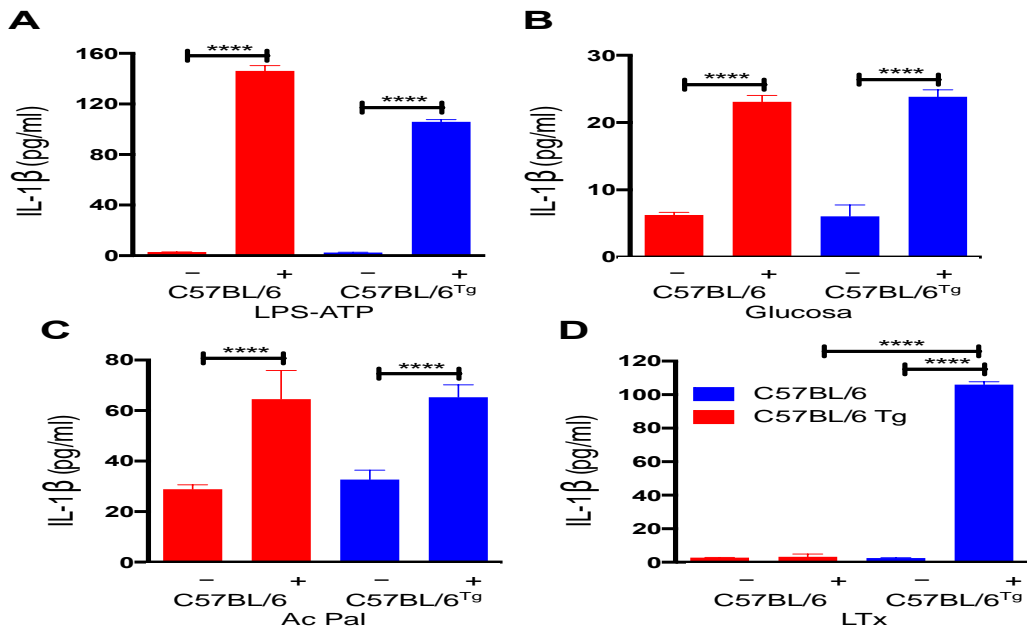


Figura 25. Nlrp1b1 no afecta la activación de IL-1β inducido por estímulos de estrés metabólico.

Se obtuvieron y diferenciaron macrófagos derivados de médula ósea de ratones C56BL/6 y C57BL/6J^{Tg}. Luego fueron expuestos a diversos agentes proinflamatorios. A) Exposición a LPS (100 ng/ml) durante 4 horas y posteriormente con ATP (5 mM) durante 2 horas. B) Exposición a glucosa (30 mM) durante 24 horas. C) Exposición a BSA-ácido palmítico (Ac Pal 400mM, BSA al 2%) durante 24 horas. D) Exposición a la toxina letal del ántrax (LTx, factor letal 200 ng/ml y 1 mg/ml de antígeno protector) durante 2 horas. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se determinaron los niveles de IL-1β secretada por ELISA. Balb/c n=3, C57BL/6J n=3 y C57BL/6J^{Tg} n=3. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias ± error estándar, p <0.05 (*), p <0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

Ratones C57BL/6J^{Tg} obesos modulan la dislipidemia inducido por la DAG

Históricamente los ratones se han mostrado resistentes al desarrollo de aterosclerosis inducido por las dietas altas en grasa, sin embargo, la alimentación con esta dieta por periodos prolongados resulta en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Por ello, decidimos determinar en el suero de todas las cepas de animales el perfil lipídico luego de haber sido alimentados con ambas dietas por 3 meses.

De acuerdo a los resultados las 3 cepas de ratones alimentados con DN no mostraron diferencias significativas en su perfil lipídico (Balb/c; colesterol 120mg/dL, triglicéridos 100.4mg/dL, HDL 118.5mg/dL, y VL-LDL 20.1mg/dL, C57BL/6J; colesterol 140.8mg/dL, triglicéridos 88.5mg/dL, HDL 131.4, y VL-LDL 23.1mg/dL, C57BL/6J^{Tg}; colesterol 128.9mg/dL, triglicéridos 91.6mg/dl, HDL 135.4mg/dL, y VL-LDL 14.7mg/dL, Figura 26).

Sin embargo, la cepa C57BL/6J alimentada con DAG, mostró valores significativamente elevados ($p < 0.05$) tanto para el colesterol 175.7mg/dL, triglicéridos 105.9mg/dL y VL-LDL 76.7mg/dL, y significativamente bajo ($p < 0.05$) de HDL 103.9mg/dL. En contraste las cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg} mostraron valores bajos y muy semejantes (Balb/c; colesterol 142.8mg/dL, triglicéridos 95.1mg/dL, HDL 130mg/dL, VL-LDL 22.8mg/dL, C57BL/6J^{Tg}; colesterol 138.4mg/dL, triglicéridos 83.1mg/dL, HDL 129.9mg/dL y VL-LDL 25.5mg/dL, Figura 26).

Congruente con esto, confirmamos que los animales alimentados con la dieta obesogénica específicamente la cepa C57BL/6J mostraba mayor acumulación de vacuolas lipídicas, signo de esteatosis hepática. Mientras que las cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg}, al analizar las histografías obtenidas de cortes procesados y teñidos por la técnica de H&E del tejido hepático se observó menor acumulación de vacuolas lipídicas (Figura 27).

Sorpresivamente, observamos en los ratones transgénicos obesos un aumento significativo en los niveles de HDL el cual es un colesterol relacionado con un riesgo aterogénico menor, entre mayor sean sus niveles. Mientras que, los niveles de VL-LDL fueron significativamente bajos en los ratones transgénicos en comparación con los silvestres. Estos datos sugieren que, los ratones con el alelo *Nlrp1b1* muestran una disminución en las alteraciones en el metabolismo de lípidos resultante de una dieta obesogénica. En conjunto estos datos indican que el alelo *Nlrp1b1* reduce la dislipidemia en ratones transgénicos obesos.

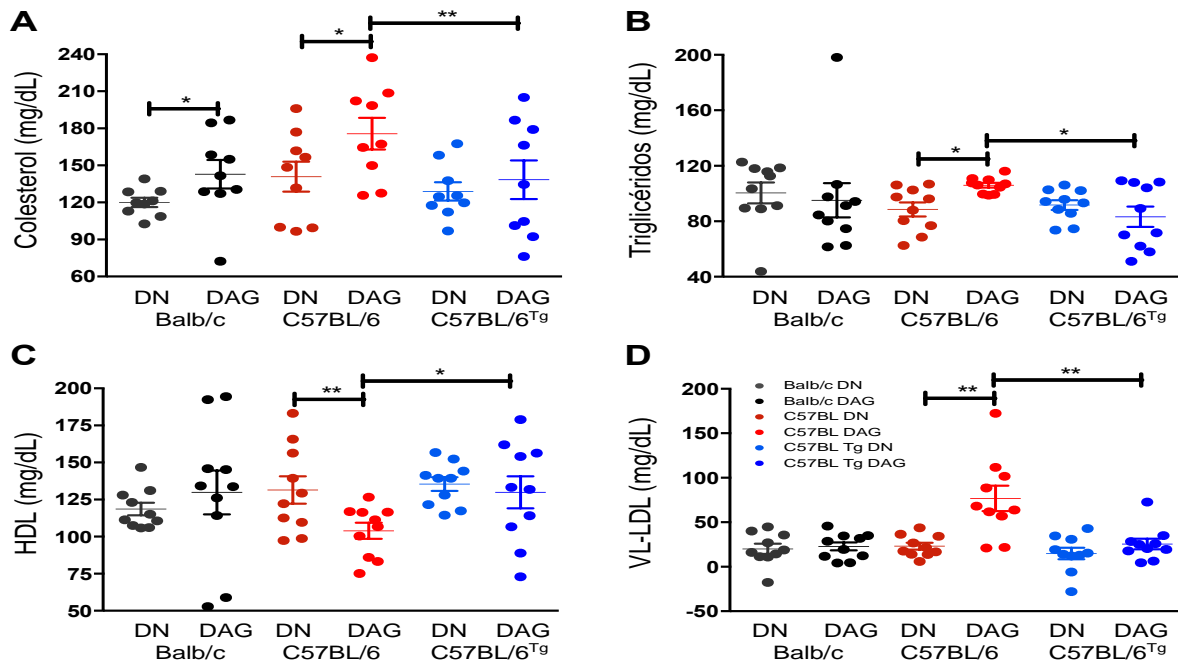


Figura 26. Nlrp1b1 mejora el perfil lípidos en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 6 horas previo al sacrificio, para obtención del suero. A) Análisis del colesterol total circulante. B) Análisis de triglicéridos totales circulante. C) Análisis del HDL total circulante. D) Calculo y análisis del VL-LDL total circulante. Balb/c n=10 C57BL/6J n=10, C57BL/6J^{Tg} n=10. Prueba estadística realizada ANOVA. En las gráficas se muestran las medias \pm error estándar, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****).

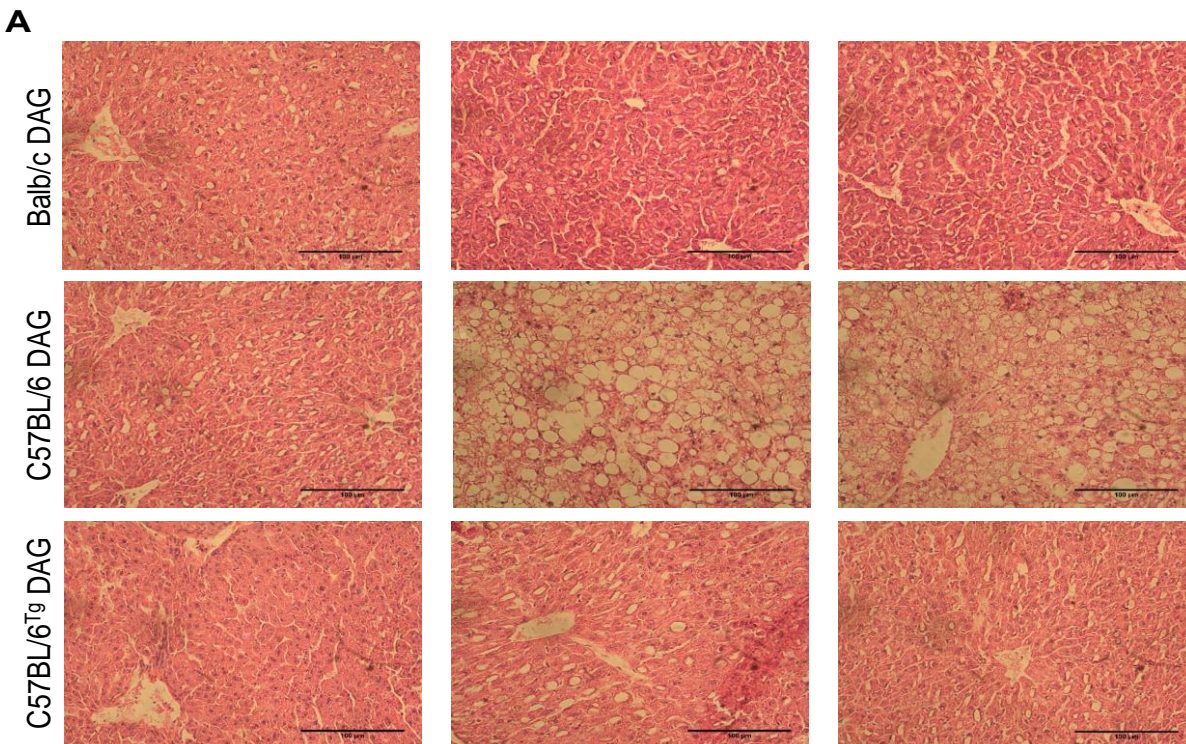


Figura 27. Nlrp1b1 reducen la acumulación de lípidos en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Luego del sacrificio se obtuvo tejido hepático para su análisis. A) Micrografías de tejido hepático (20x). La barra en las micrografías representa 100µm. Balb/c n=3 C57BL/6J n=3, C57BL/6J^{Tg} n=3, tomando 10 fotos por ratón. Micrografías obtenidas por microscopia confocal invertido 20x.

El alelo *Nlrp1b1* promueve la lipólisis en el tejido adiposo en obesos a través de la producción de la IL-18.

Debido a que observamos una disminución en los niveles de Casp-1 e IL-1 β en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J^{Tg}, y dado que, recientemente se demostró que la producción de la IL-18 dependiente del inflammasoma *Nlrp1* previene la obesidad [199]. Decidimos determinar los niveles de IL-18 en el tejido adiposo de las 3 cepas de ratones alimentadas con ambas dietas.

De manera interesante, tanto los ratones Balb/c como los C57BL/6J^{Tg} independientemente de la dieta producen niveles similares de IL-18 madura en el tejido adiposo, pero al ser alimentados con una dieta obesogénica los animales de ambas cepas producen mayores niveles de IL-18 madura (Figura 28A-B). En cambio, los ratones C57BL/6J independientemente de la dieta, mostraron niveles significativamente reducidos de IL-18 madura en comparación con los animales Balb/c y C57BL/6J^{Tg} ($p < 0.01$, Figura 28A-B).

Congruente con esto, al determinar los niveles de activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) a través de evaluar el estado de fosforilación en la serina 660 (pHSL^{Ser660}). Encontramos mayores niveles de pHSL^{Ser660} en el tejido adiposo de animales C57BL/6J^{Tg} obesos en comparación con los observados en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J obesos ($p < 0.05$, Figura 29A-B). Aunado a esto, observamos menores niveles de perilipina, una proteína asociada a la superficie de gotas lipídicas que se ve disminuida durante la lipólisis, en el tejido adiposo de animales C57BL/6J^{Tg} obesos en comparación con los niveles encontrados en ratones C57BL/6J obesos ($p < 0.05$, Figura 29C).

Para confirmar que IL-18 promueve la lipólisis, expusimos adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1 a la IL-18 y determinamos los niveles de fosforilación de pHSL^{Ser660}. Como se esperaba, en respuesta al isoproterenol un agonista del receptor β -adrenérgico se indujo la fosforilación de HSL^{Ser660} a los 15 min después del tratamiento (Figura 30A-B). Con respecto a la estimulación con la IL-18, esta también promovió la fosforilación de HSL^{Ser660} independientemente de la concentración usada (10 ng/ml o 50 ng/ml, Figura 30A-B).

En conjunto estos datos indican que, en respuesta a un exceso calórico, el inflammasoma *Nlrp1b1* produce más IL-18 que el inflammasoma *Nlrp1b2*. Es probable que niveles elevados de IL-18 mantengan la lipólisis, de esta forma se reduce la inflamación en el tejido adiposo, así como la dislipidemia.

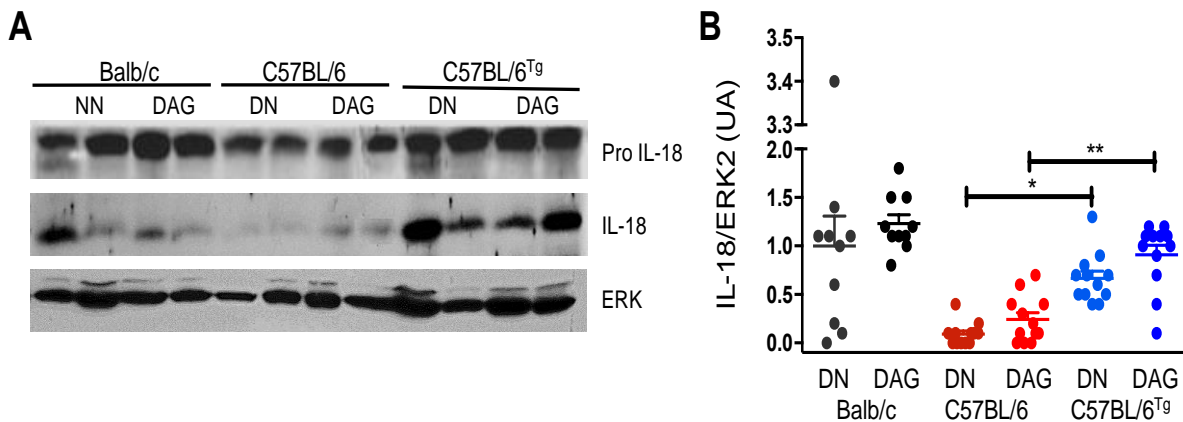
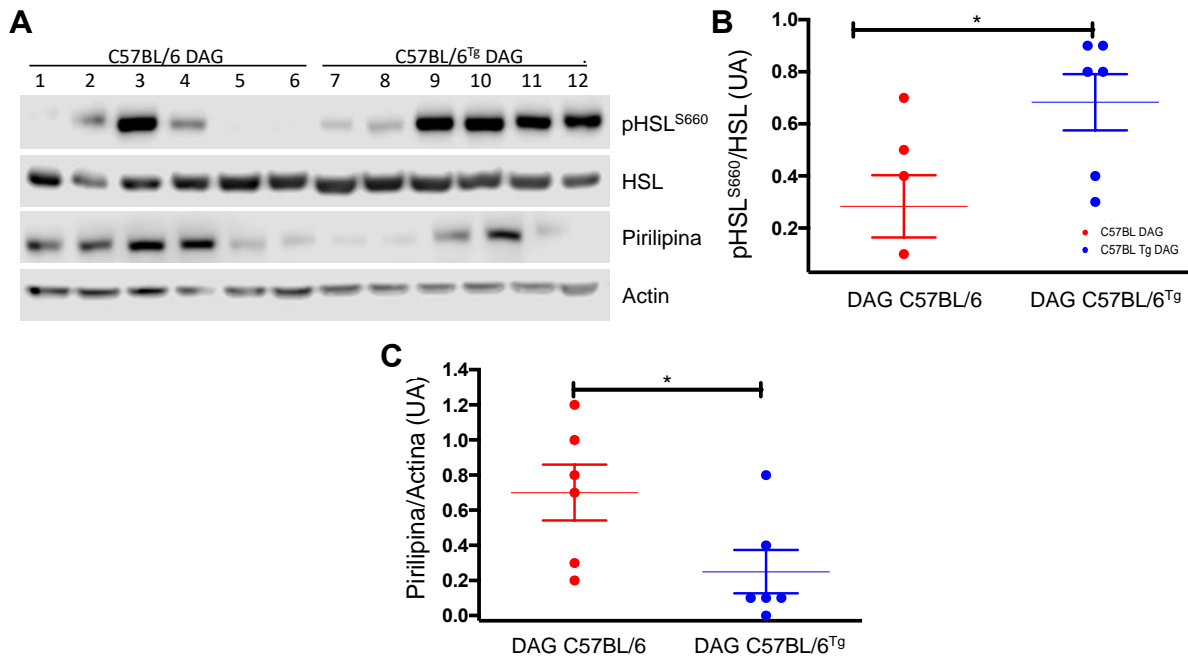


Figura 28. Nlrp1b1 promueve la producción de IL-18 en ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Luego del sacrificio se obtuvo tejido adiposo retroperitoneal para su análisis. A) WB de proIL-18 e IL-18 en tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con una dieta DN y DAG. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de IL-18 en tejido adiposo retroperitoneal. Se normalizaron los valores del grupo de ratones Balb/c DN a 1 para observar diferencias. Se utilizó Erk2 como control de carga. Balb/c n=10 C57BL/6J n=12, C57BL/6J^{Tg} n=12. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$



(***).

Figura 29. IL-18 promueve la lipólisis en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos.

Luego del sacrificio se obtuvo tejido adiposo retroperitoneal para su análisis. A) WB de pHSL^{S660} y HSL en tejido adiposo de ratones Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con una dieta DN y DAG. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de Perilipina y Actina en tejido adiposo retroperitoneal. Se normalizaron los valores del grupo de ratones C57BL/6J a 1 para observar diferencias en los niveles de C57BL/6J^{Tg}. Se utilizó HSL y Actina como control de carga. Balb/c n=10 C57BL/6J n=12, C57BL/6J^{Tg} n=12. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***)

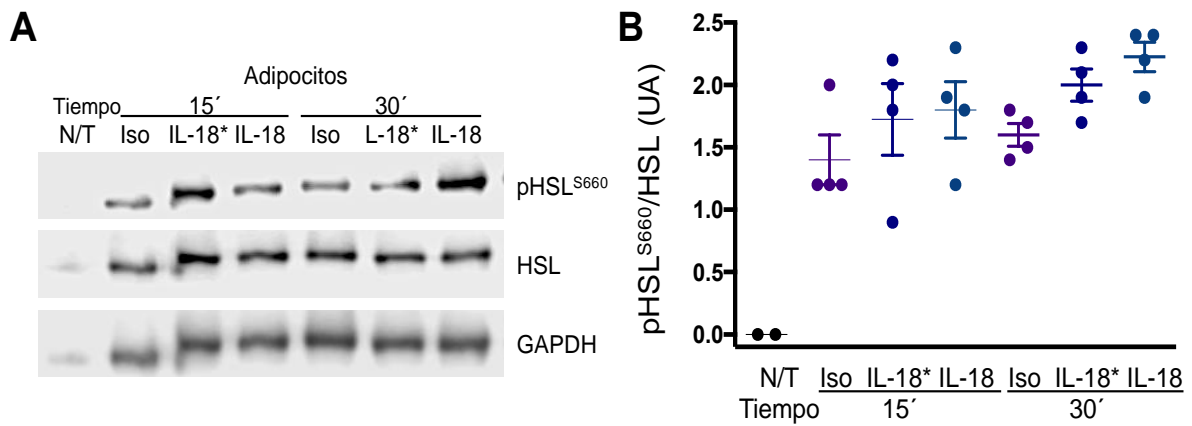


Figura 30. La IL-18 promueve la activación de HSL en células 3T3-L1.

Los adipocitos derivados de 3T3-L1 fueron tratados con vehículo (N/T) o con isoproterenol 10 u (Iso), o con IL-18 recombinante (IL-18*; 10ng/ml o IL-18; 50ng/ml) durante 15 y 30 minutos. Después de ese tiempo, se recolectaron las células y se prepararon extractos de proteínas. A) WB de pHSL^{S660} en adipocitos derivados de 3T3L-1. B) Cuantificación densitométrica de los niveles de pHSL^{S660}. Se normalizaron los valores con grupo Iso 15' a 1 para observar diferencias. Se utilizó GAPDH como control de carga. Experimento realizado 4 veces. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias ± error estándar. p<0.05 (*), p<0.01 (**), y p<0.0001 (***).

Los efectos de Nlrp1b1 sobre el metabolismo de carbohidratos no son mediados por células del sistema inmune.

Debido a la activación del inflamasoma Nlrp3 en las células del sistema inmune infiltradas en el tejido adiposo de animales obesos, eventualmente estas conducen al establecimiento de la inflamación crónica local y sistémica, lo cual conlleva al desarrollo de alteraciones metabólicas. Por ello, decidimos averiguar si la mejora que observamos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos, se debía a la expresión del alelo Nlrp1b1 en células hematopoyéticas.

Para probar esto, ratones C57BL/6J se sometieron a radiación ionizante con una dosis subletal (900rads por 3min) en un equipo irradiador autoblandado Gammacell-1000 con fuente radiactiva sellada de Cs¹³⁷. Los ratones estuvieron dentro de jaulas especialmente diseñadas con las medidas de la cámara de irradiación, de modo que se expusiera el cuerpo entero. 6 horas después de la radiación se repoblaron las células inmunes por medio del trasplante de células de médula ósea (CMO) de ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} donantes.

Los animales C57BL/6J reconstituidos con CMO de ratones transgénicos y silvestres se mantuvieron con DN por 5 semanas. Posteriormente, determinamos si había diferencias en el peso y metabolismo. De acuerdo a los datos, no observamos diferencias en su peso (C57BL/6J; 22.6g ± 0.6, C57BL/6J^{Tg}; 22.9g ± 1.3, Figura 31A), ni en los niveles de glucosa basal (C57BL/6J; 236.3 mg/dL, C57BL/6J^{Tg}; 210 mg/dL, Figura 31B), ni en la tolerancia a la glucosa (Figura 31C). Por lo que iniciamos la admiración con la dieta obesogénica.

Luego de 10 semanas con la DAG, determinamos parámetros morfométricos, así como metabólico. Con respecto al peso, sorprendentemente no se observaron diferencias en su ganancia (C57BL/6J; 33.2g ± 2.8, C57BL/6J^{Tg}; 32.6g ± 2.9, Figura 32A), tampoco en la ingesta de alimento (C57BL/6J; 15.3g ± 2.8, C57BL/6J^{Tg}; 14.8g Figura 32B-C).

En el caso de la glucosa basal, no se observaron diferencias (C57BL/6J; 240.6 mg/dL, C57BL/6J^{Tg}; 217.4 mg/dL, Figura 33A), tampoco en la tolerancia a la glucosa (Figura 33B-C). Por consiguiente, procedimos a su sacrificio y constatamos que tampoco existían diferencias en el peso de sus órganos metabólicamente activos (Figura 34A).

Para confirmar el éxito del trasplante evaluamos la presencia del transgén en las células hematopoyéticas de la médula ósea de los ratones receptores, por medio de PCR. Confirmamos la presencia del alelo Nlrp1 solo en animales trasplantados con CMO de ratones C57BL/6J^{Tg} (Figura 34B). Estos resultados indican que el efecto de la expresión del alelo Nlrp1b1 sobre el metabolismo de

carbohidratos, no es dependiente de su expresión en células mieloides que se generaron a partir de las células trasplantadas bajo nuestro protocolo experimental.

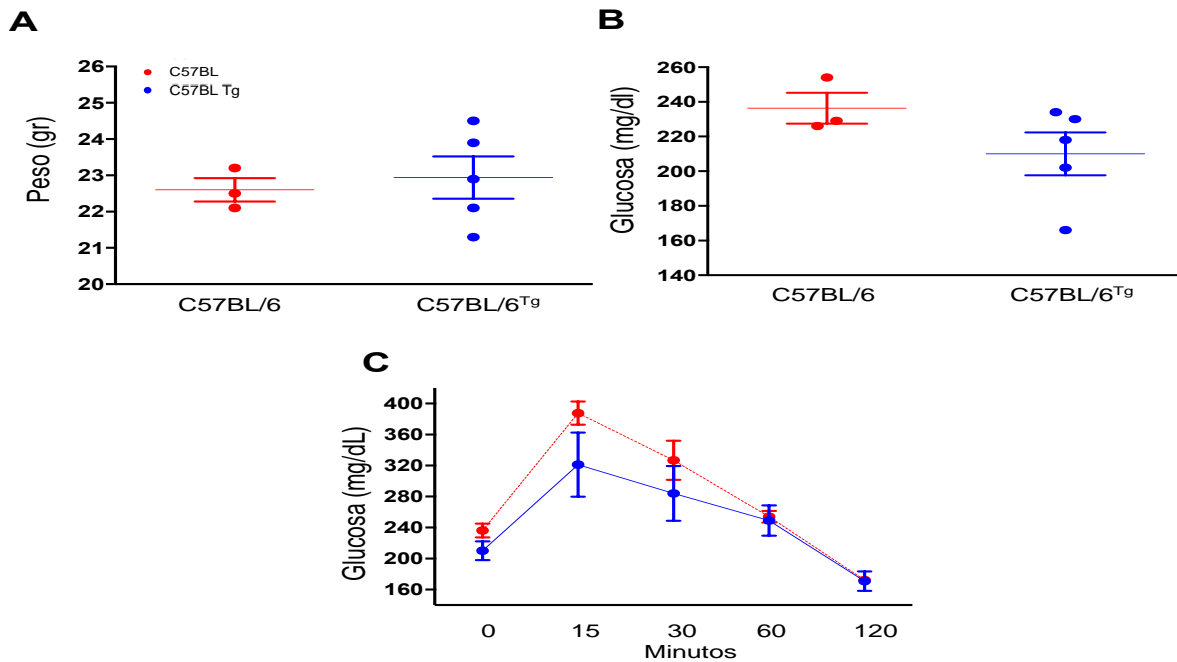


Figura 31. Parámetros basales post radiación en ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} alimentados con DN.

Luego de 5 semanas post radiación y con DN, se analizaron algunos parámetros morfométricos y metabólicos. Para ello, se mantuvieron por 6 horas en ayuno. A) Peso inicial de los ratones. B) Niveles de glucosa basal. C) GTT intraperitoneal (1.8 mg/gr de D-glucosa). C57BL/6J n=3 y C57BL/6J^{Tg} n=5. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***)

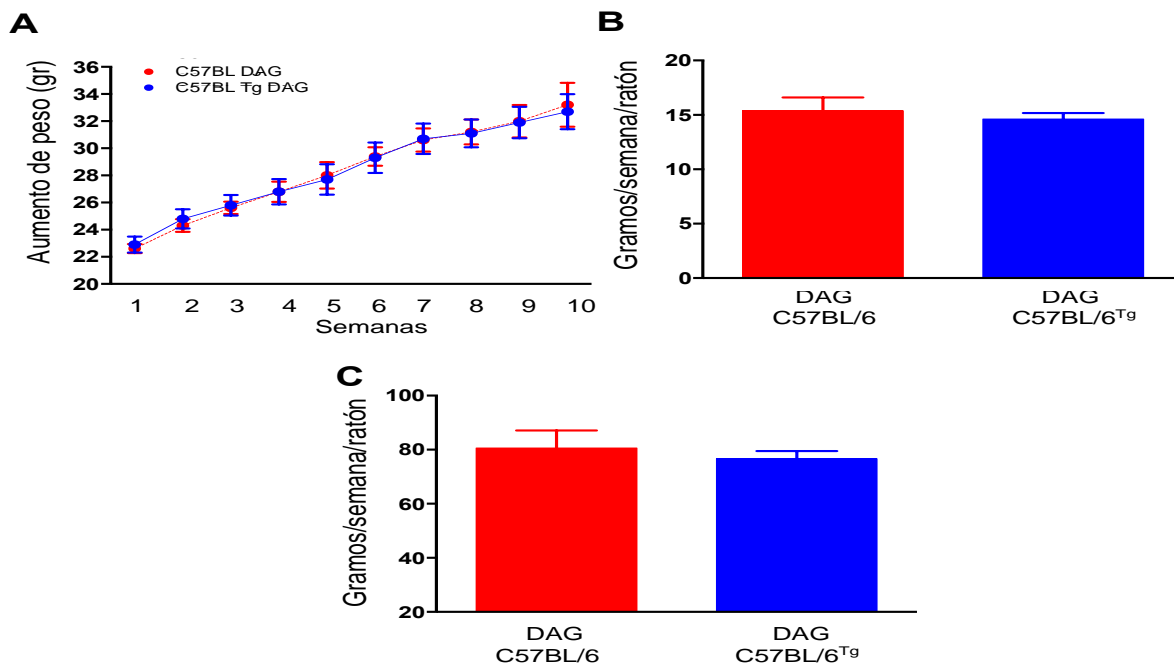


Figura 32. El trasplante de CMO no afectan la ganancia de peso, ni el consumo luego de 10 semanas con DAG.

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con DAG durante diez semanas. A) Ganancia de peso semanal, monitoreado por 10 semanas. B) Consumo en gramos de alimento DAG por ratón por semana. C) Cálculo del consumo calórico por ratón por semana. C57BL/6J n=3, y C57BL/6J^{Tg} n=5. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***)

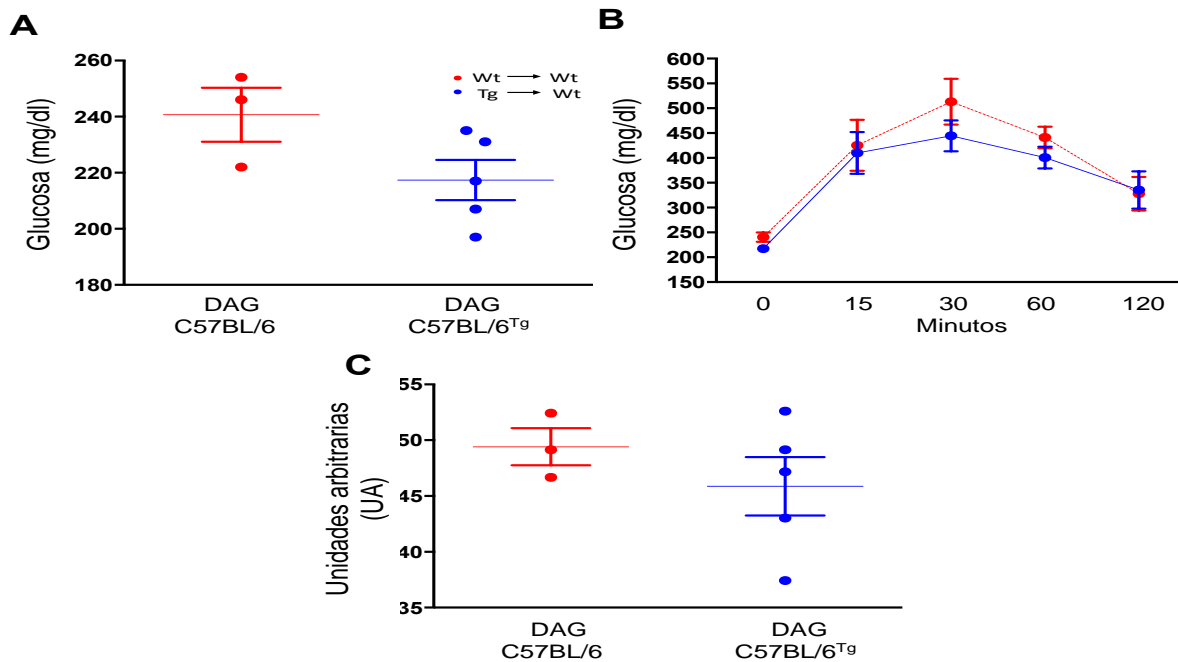


Figura 33. El trasplante de CMO no regulan el metabolismo de carbohidratos luego de 10 semanas con DAG.

Luego de 6 horas de ayuno se determinaron los niveles de glucosa basal y se procedió a realizar las pruebas de GTT y ITT, a las diferentes cepas de ratones. A) Niveles de glucosa basal. B) GTT intraperitoneal (1.8 mg/gr de D-glucosa). C) Área bajo la curva. C57BL/6J n=3 y C57BL/6J^{Tg} n=5. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***).

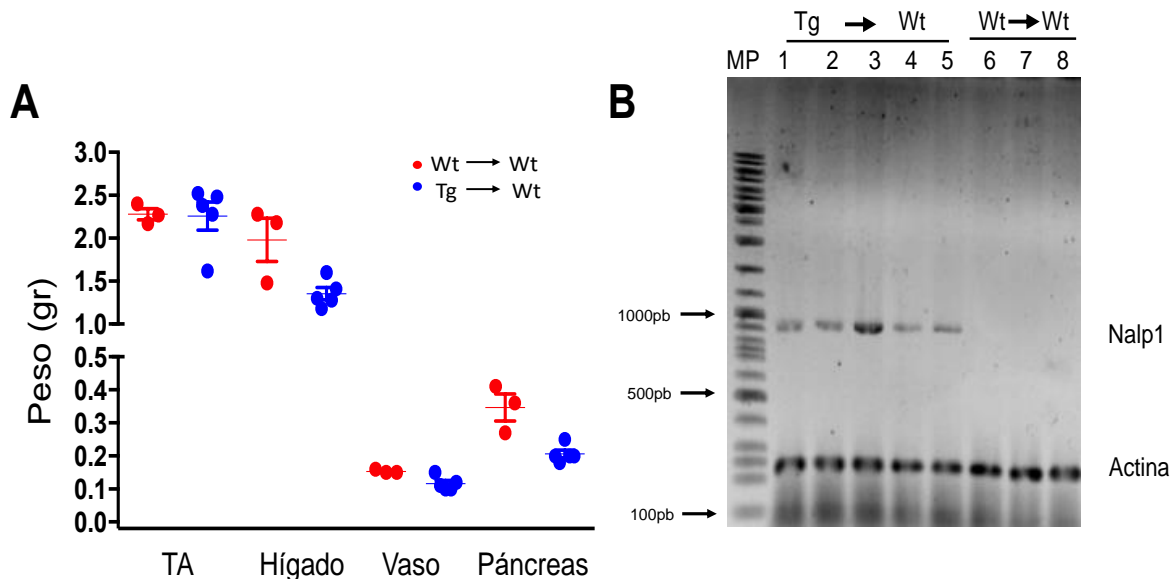


Figura 34. La expresión de *Nlrp1b1* en el compartimento hematopoyético no tiene un efecto sobre los órganos.

Se extrajeron y pesaron los órganos de ratones C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}. A) Peso de órganos. B) Producto de amplificación de *Nalp1* por PCR punto final. Para ello, obtuvimos DNA de cola de ratones y realizamos PCR de la misma forma que cuando realizamos genotipificación. C57BL/6J n=3 y C57BL/6J^{Tg} n=5. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***).

Variantes de nucleótidos únicos en el gene NLRP1 humano asociados al metabolismo de lípidos.

De acuerdo con nuestros resultados, los ratones obesos que expresan el alelo *Nlrp1b1*, mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, presentaron un disminuido proceso inflamatorio en el tejido adiposo a través de promover un ambiente antiinflamatorio, así como una mayor producción y maduración de la IL-18. Lo que promovió la lipólisis y una disminución en la dislipidemia. Sin embargo, esto no impidió que los ratones C57BL/6J^{Tg} ganaran el mismo peso que los ratones C57BL/6J, es decir, presentaron un fenotipo conocido como “obesos metabólicamente sanos” [221].

El hecho de que los ratones C57BL/6J^{Tg} que expresan el alelo *Nlrp1b1*, y que los ratones Balb/c que portan el alelo *Nlrp1b1* presentaron resistencia a desarrollar alteraciones metabólicas cuando se alimentan con un exceso calórico. En conjunto con el hecho de que los ratones deficientes de *Nlrp1a*, *Nlrp1b2* y *Nlrp1c* son más susceptibles a desarrollar obesidad y alteraciones metabólicas, indica que el alelo *Nlrp1b1* es el gen que puede atenuar las alteraciones metabólicas inducidas por el exceso calórico. Esto sugiere que variantes alélicas de diferentes inflamomas tienen efectos diferentes en el desarrollo de la obesidad y diabetes.

Debido a lo anterior, y dado que la variabilidad genética asociada a polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades [222,223]. Evaluamos la posibilidad de que SNPs en el gene NLRP1 humano se asociaran con alteraciones metabólicas en una población mestiza mexicana.

Para cumplir esta meta, en conjunto con el grupo de trabajo de la Dra. Lorena Orozco del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), se realizó un análisis *in silico* para identificar y predecir la ubicación de SNPs en su base de datos [224]. De acuerdo al análisis, se identificaron algunos SNPs sobre algunos individuos, y aunque estos fueron de baja frecuencia, es decir, en menor proporción. Destaco que dichos SNPs estuvieran relacionados con parámetros metabólicos parecidos a los observados en los ratones C57BL/6J^{Tg} obesos de nuestro estudio. Pues se asociaron como altos niveles de glucosa, colesterol y con cierto grado de obesidad (Tabla 4).

De acuerdo a lo anterior, se identificó al SNP rs884367 en mayor frecuencia entre los individuos, y se asoció a mayores niveles de HDL y así como un IMC alto (Tabla 4). Cabe mencionar que, dicho SNP resultó ser sinónimo, por lo que el cambio de su nucleótido C por G no altera el aminoácido de la proteína (Tabla 4).

Posteriormente, determinamos que el 7% de una población indígena mexicana poseían la presencia del SNP rs884367 en el gen NLRP1 [224], esto al genotipificar 968 muestras de dicha población (Figura 35A-B). Sin embargo, aun no tenemos las correlaciones con su estado metabólico para determinar si el poseer este SNP los hace mas susceptibles o los protege de alteraciones metabólicas.

Por otro lado, constatamos que el 7% de una población mestiza mexicana de individuos con obesidad mórbida, también poseían el SNP rs884367 en el gen NLRP1 al genotipificar 507 muestras de esta población (Figura 35C). Más aun, al determinar los niveles de la IL-18 en el tejido adiposo por medio de WB, observamos una mayor tendencia en los individuos con homocigotos G/G, es decir, en los individuos que presentaron el SNP rs884367 (Figura 35D). Mientras que individuos homocigotos para C/C, y heterocigotos C/G presentaron una menores niveles de la IL-18 (Figura 35D).

Si bien, aun hace falta recabar mas información para poder determinar un efecto protector por parte del SNP rs884367 identificado, estos datos nos sugieren que es probable que este SNP afecte la función del gen NLRP1. De esta forma, el SNP puede conferir ciertas modificaciones al RNA mensajero (mRNA) o proteína de tal forma que bajo un contexto metabólico en el que predomine la obesidad, puede incrementar los niveles de IL-18 en individuos obesos y esto, se vea reflejado en una mejora en el metabolismo de lípidos, a pesar de que este SNP se ha considerado silencioso.

Tabla 4. Análisis estadístico de las frecuencias alélicas.

| GLUCOSA | | | | | | |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| CHR | SNP | BP | A1 | MAF | BETA (L95-U95) | P |
| 17 | var_17_5433782 | 5433782 | G | 0.000131857 | 257.4 (140.6-374.2) | 1.73E-05 |
| COLESTEROL TOTAL | | | | | | |
| 17 | rs150677537 | 5433803 | C | 0.000263713 | 116.5 (31.44-201.6) | 0.007396 |
| HDL-C | | | | | | |
| 17 | var_17_5433954 | 5433954 | T | 0.000791139 | 33.52 (17.32-49.71) | 5.38E-05 |
| 17 | rs884367 | 5487164 | G | 0.247689 | 1.386 (0.1901-2.582) | 0.02333 |

*CHR= cromosoma, SNP= polimorfismos de nucleótidos únicos, BP= posición física (pares de base; base-pair), A1= alelo, MAF= Frecuencia de alelos menores, BETA= Coeficiente de regresión.

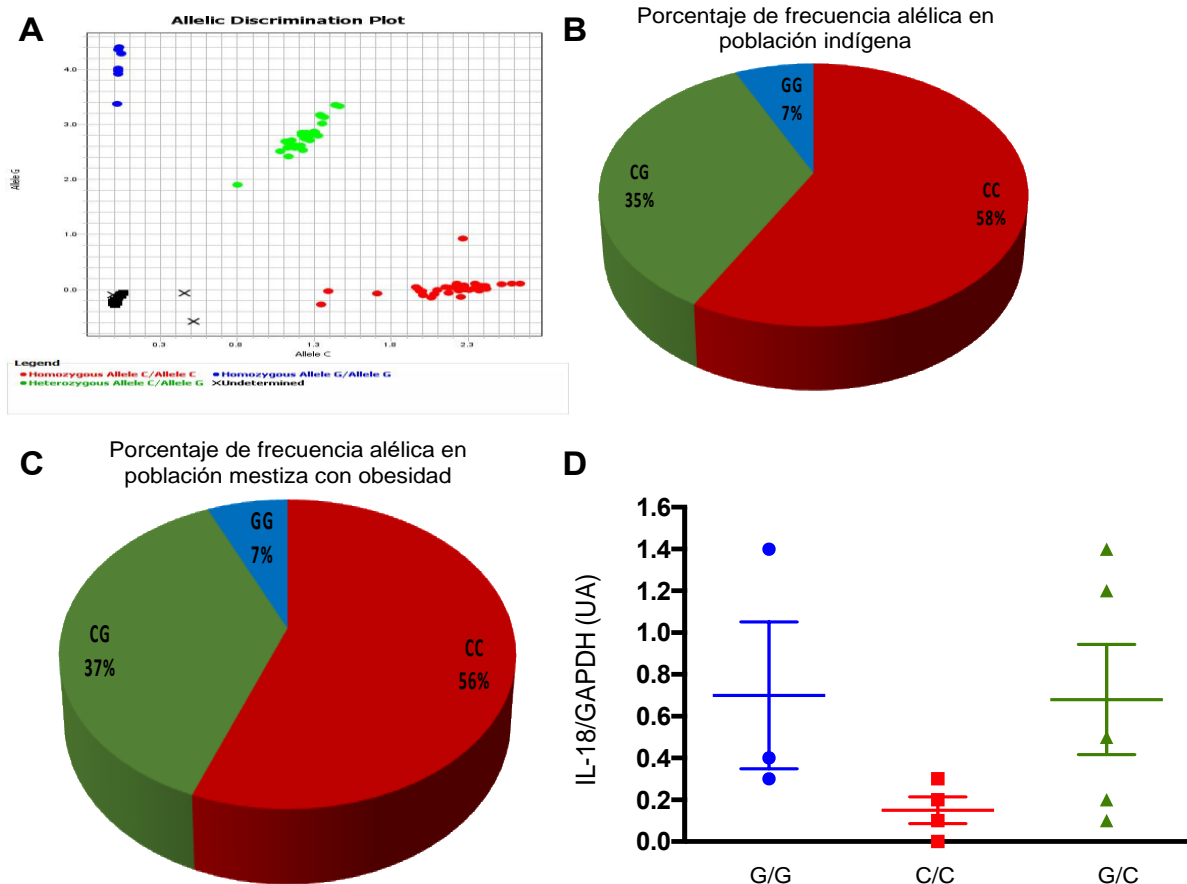


Figura 35. Análisis del SNP rs884367 e IL-18 en una población mexicana.

Análisis estadístico sobre la frecuencia del SNP rs884367 y su relación con la IL-18 en el tejido adiposo. A) Plot representativo sobre la discriminación alélica en una población indígena. B) Porcentaje de frecuencia alélica en una población indígena. C) Porcentaje de frecuencia alélica en una población mestiza con obesidad mórbida. D) Cuantificación densitométrica de los niveles de IL-18 en tejido adiposo de una población mestiza con obesidad mórbida, sin DM2. Se utilizó GAPDH como control de carga. G/G n=3, C/C n=4 y C/G n=5. Prueba estadística realizada ANOVA. En la gráfica se muestran las medias \pm error estándar. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (***)

DISCUSIÓN

Como sabemos, el tejido adiposo no solo tiene un papel importante en el almacenamiento de energía, sino que también tiene la capacidad de detectar el estado nutricional y regular la movilización de energía, en general mantiene la homeostasis del balance energético. Sin embargo, en caso de que el balance sea positivo, esto conduce a la acumulación excesiva de energía en el mismo, lo cual conlleva a una condición de sobrepeso u obesidad y ello, predispone a los individuos al desarrollo de alteraciones metabólicas [70].

Ratones C57BL/6J^{Tg} muestran una mejor tolerancia y sensibilidad a insulina a través de mantener niveles bajos de insulina y leptina.

Como sabemos, la distribución de la grasa sobre todo en la zona visceral está relacionada con el riesgo de desarrollar diversos trastornos metabólicos, entre los que destaca principalmente la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y dislipidemias [69]. Por ello, previo a la alimentación con la DAG decidimos comprobar que no existieran diferencias en metabolismo basal de las diferentes cepas de ratones alimentadas con DN (Figura 13), esto a través de las pruebas de tolerancia a glucosa (GTT) y resistencia a insulina (ITT).

Como se sabe en la GTT, se administra un bolo de glucosa mediante inyección intraperitoneal (IP) según el peso del animal. Luego, se recolectan muestras de sangre venosa en serie a través de cierto periodo (generalmente de la cola) para evaluar la glucosa con un medidor de glucosa. Particularmente, el propósito es averiguar la cantidad secretada de insulina en respuesta al glúcido. Cuanto mayor sea el despeje de la glucosa durante el periodo, mayor es la tolerancia a la glucosa [225]. En la ITT, se inyecta insulina mediante inyección intraperitoneal (IP) según el peso del animal. De igual forma, se registra el cambio en la glucosa en sangre como en la GTT. Conceptualmente, cuanto mayor es la disminución de la glucosa en sangre, mayor es la sensibilidad a la insulina [225].

De acuerdo a los datos, observamos que en los ratones con DN no existían diferencias en el metabolismo tanto en los animales Balb/c y C57BL/6J, así como en los transgénicos (C57BL/6J^{Tg}), pues todos respondieron de forma muy similar ante el estímulo con el glúcido e insulina (Figura 13). Al realizar la caracterización de la respuesta metabólica en las mismas cepas alimentadas con la DAG, primeramente, encontramos que en los ratones C57BL/6J^{Tg} no se afectó la ganancia de peso, pues ganaron un peso muy similar a la cepa C57BL/6J con ambas dietas (Figura 14), aunado al hecho de ambas cepas registraron la misma ingesta de ambos tipos de alimento (Figura 14).

Sin embargo, los animales C57BL/6J^{Tg} a pesar de tener obesidad, presentaron menor susceptibilidad a desarrollar alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, ya que mostraron una mejor tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina en comparación con la cepa silvestre (Figura 15-Figura 16). En este sentido, al cuantificar los niveles de insulina observamos que eran menores en los animales C57BL/6J^{Tg} independientemente de la dieta, tanto en condiciones basales o bajo la estimulación con un glúcido (Figura 17).

Esto es importante pues resalta el hecho de que, los ratones transgénicos fueron menos propensos a presentar intolerancia a glucosa y esto, no tiene que ver con el hecho de que secreten mayor cantidad de insulina, pues como observamos la cepa silvestre muestra intolerante a glucosa además de presentar HI (Figura 17). Adicionalmente, observamos que los animales transgénicos presentan una mejor sensibilidad a la insulina, en cambio los silvestres debido a la HI presentan resistencia a la insulina en tejidos metabólicamente activos como son hígado y músculo, es decir, estos órganos dejaron de responder a la insulina normalmente secretada y por ello, muestran niveles altos de insulina para compensar su baja respuesta (Figura 18).

De acuerdo a la literatura, la intolerancia a la glucosa es una condición metabólica que resulta de la hiperglucemia y que pone a los individuos en alto riesgo de desarrollar diabetes [151]. Se sabe que la intolerancia a la glucosa difiere de la resistencia a la insulina debido a que, 1) se presentan alteraciones en la glucosa en ayunas predominantemente por resistencia a la insulina hepática, pero se tiene sensibilidad normal a la insulina en el tejido muscular. Sin embargo, se muestran defectos en la secreción de la insulina en la fase temprana en respuesta a la glucosa. 2) Se presenta intolerancia a la glucosa debido a la resistencia a la insulina en el tejido muscular, además de exhibir defectos en la secreción de la insulina en la fase temprana y tardía [226].

En la obesidad el desarrollo DM2 es debida a la resistencia a la insulina, también asociada a la HI. Una posible causa de esto es que las células β pancreáticas fueron hiperestimuladas para liberar más insulina y así, controlar la hiperglucemia [25]. Aunque el mecanismo fisiológico por el cual, la cepa transgénica a pesar de registrar menor cantidad de insulina respondió mejor en las pruebas metabólicas, no es clara. Podríamos suponer que la expresión del alelo *Nlrp1b1*, puede tener un efecto sobre las células β pancreáticas, ayudando a tener un control sobre la producción de insulina y retardando los efectos deletéreos de una DAG y con ello, se evita la HI de esta forma se contribuye a que los tejidos metabólicamente activos sigan teniendo sensibilidad a la insulina.

Con respecto a la leptina, se sabe que esta hormona correlaciona con las reservas de grasa y responden a los cambios en el equilibrio energético [50]. Algunos modelos de obesidad genéticos e inducidos por dieta en donde la leptina no cumple su función incluyen a los ratones deficientes en leptina *ob/ob* y a los ratones deficientes en el receptor de leptina *db/db*, así como a las ratas Zucker diabéticas [218]. Dentro de las observaciones a destacar en estos modelos es que presentan hiperfagia e HI lo que correlaciona con obesidad, y al menos parte de la HI puede atribuirse al hecho de que la leptina normalmente actúa para suprimir la síntesis y secreción de insulina en las células β pancreáticas, es decir, existe un circuito entre la insulina y la leptina [218].

En nuestro estudio, evidenciamos que a pesar de que los animales C57BL/6J^{Tg} fueran obesos, presentaron menores niveles de leptina y adicionalmente, a través del reporte de su ingesta observamos una caída el consumo de alimento posterior a la semana 7 que se mantuvo hasta la semana 12 (Figura 19). Mientras que en la cepa silvestre paso lo contrario, pues presentaron niveles elevado de leptina, así como un ligero aumento del consumo de alimento de la semana 9 en adelante (Figura 19). Sería interesante llevar por mas tiempo a las cepas silvestres y transgénicas con ambas dietas para observar quizás de forma mas clara si se mantiene esta caída en la ingesta, por lo que quizás se estaría modulando por la participación del Nlrp1b1.

En este sentido, sabemos que la leptina y la insulina comparten efectos comunes en el control de la ingesta de alimentos y el metabolismo energético [227]. La leptina también disminuye la producción de glucosa hepática, aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye los niveles de glucagón [228]. Dado que observamos menores niveles de leptina en los animales que expresan Nlrp1b1, es probable que este efecto sea debido a la conexión existente entre la insulina y leptina y ello, retarde las alteraciones metabólicas ocasionadas por la dieta obesogénica en estos animales.

Esta interacción entre leptina e insulina en los animales transgénicos los mantendría menos propensos a desarrollar intolerancia a la glucosa, así como resistencia a la insulina y leptina como observamos, sin embargo, el mecanismo por el cual podría ser no es claro por lo que faltarían mas experimentos por realizar.

Ratones C57BL/6J^{Tg} mantienen un perfil antiinflamatorio en el tejido adiposo a través de la disminución del procesamiento de Casp-1 e IL-1 β .

Durante la obesidad se produce un agrandamiento del tejido adiposo para almacenar el exceso de ingesta energética. La hiperplasia (aumento del número de células) y la hipertrofia (aumento del tamaño de las células) son dos posibles mecanismos de crecimiento del tejido adiposo para llevar a acabo esta

función [229]. Actualmente existe una controversia con respecto a si la hipertrofia en los adipocitos antecede a la hiperplasia de los mismos y con ello, satisfacer la necesidad adicional del almacenamiento de grasa en la progresión hacia la obesidad [73,230]. Mientras que en la hiperplasia, se ha observado que equilibra la hipertrofia y así, regular la homeostasis del tejido adiposo, ya que aumenta la capacidad proliferativa de los preadipocitos para contender con las altas cargas de almacenamiento de grasas [231].

Para abordar los efectos ocasionados por la dieta en los ratones transgénicos sobre el proceso dinámico del crecimiento del tejido adiposo, primeramente, observamos existen diferencias en la estructura de los adipocitos pues al parecer la cepa Balb/c muestra un patrón de hiperplasia mientras que las cepas C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg} muestran un patrón de hipertrofia (Figura 20). Con respecto al infiltrado celular en las tres cepas con DN, se observa una disminuida infiltración (Figura 21) lo que hace suponer corresponde solo a las células residentes.

Sin embargo, en la comparación del desarrollo de obesidad inducida por la DAG en estas tres cepas, observamos que tanto la genética como la dieta tiene un papel importante en la distribución y la estructura de los adipocitos. En el caso de las cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg} se observan adipocitos ahora más hipertróficos (Figura 20). Mientras que la cepa C57BL/6J muestran adipocitos de igual forma más hipertróficos, pero cabe resaltar que también muestra cierto grado de heterogeneidad pues se observan adipocitos grandes y pequeños (Figura 20).

Esto nos hace suponer que debido a la expresión del alelo Nlrp1b1 (factor genético) y la dieta, en las cepas Balb/c y C57BL/6J^{Tg} se desarrolla primeramente hipertrofia, precisamente para contender con las altas cargas de grasa y así, tratar de mantener la homeostasis del tejido adiposo. Mientras que en la cepa C57BL/6J pudieran llevarse acabo tanto la hipertrofia e hiperplasia, pues se ha perdido el control de la homeostasis, y los adipocitos pequeños pudieran ser adipocitos nuevos o muertos.

Al comparar los resultados experimentales entre nuestros modelos, encontramos que la hipertrofia está fuertemente correlacionada con la dieta. Debido a nuestra metodología, no podemos evidenciar claramente la hiperplasia, pero podríamos suponer que esta depende de ciertos factores relacionados a la cepa, nuevamente, lo que sugiere una interacción entre la genética y la dieta.

De acuerdo a nuestros resultados, observamos una mejor tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina en la cepa transgénica (Figura 15), y dado que, en la obesidad se asocia de una inflamación crónica en el tejido adiposo, y esta metainflamación es la responsable de alterar el metabolismo de carbohidratos [87]. Evidenciamos que efectivamente en los ratones Balb/c y C57BL/6J^{Tg} (Nlrp1b1) se

cuantificaron menores células infiltradas en su tejido adiposo, en comparación con la cepa silvestre (Nlrp1b2) que fue registro mayor infiltración celular (Figura 21).

En este contexto, no solo fue baja la infiltración celular en el tejido adiposo en la cepa transgénica obesa, sino que también registraron un número reducido de neutrófilos y macrófagos asociados a una baja expresión de quimiocinas involucradas en su migración (CCL11, GM-CSF, CXCL911-12, Figura 22, Figura 23) [232,233]. Por el contrario, la detección de células FoxP3⁺ Tregs se encontró aumentada en los transgénicos, de igual forma asociada con niveles elevados de quimiocinas involucradas en su reclutamiento (CCL1 y CCL5, Figura 22, Figura 23) [234]. Más aun, al cuantificar los niveles proteicos de Casp-1 e IL-1 β en el tejido adiposo, evidenciamos que también se encontraban bajas en la cepa transgénica obesa (Figura 24). Curiosamente, la IL-18 fue la única citocina inflamatoria que difirió en las cepas de ratones pues, observamos un aumento en sus niveles en la cepa transgénica obesa (Figura 28).

Dado que observamos una mayor presencia de neutrófilos y macrófagos en el tejido adiposo de los ratones C57BL/6J y esto se asoció con mayores niveles de citocinas proinflamatorias como Casp-1, IL-1 β , IL-6 y TNF entre otras, aunque menores niveles de la IL-18 (Figura 22-Figura 24). Pudiera ser que la expresión del alelo Nlrp1b1 promueva un mayor procesamiento de la IL-18 y esto beneficie la polarización del ambiente proinflamatorio resultante de una DAG hacia un ambiente antiinflamatorio en el tejido adiposo, aunque este mecanismo es una especulación por parte nuestra pues aun se desconoce si esto ocurre.

Se ha postulado de los beneficios que el incremento de las células Treg tiene en respuesta al daño tisular y como ayuda a la regeneración muscular [235], y como su deficiencia resulta en una autoinmunidad alterada, con una expansión masiva en el reclutamiento de monocitos proinflamatorios y activación de células mieloides [236]. De igual forma, se ha demostrado que la IL-18 puede promover tanto la diferenciación como la activación de células Tregs [237,238].

Esto podría explicar el porque nosotros encontramos un mayor reclutamiento tanto de Treg, así como mayores niveles de la IL-18 en los ratones transgénicos obesos (Figura 22-Figura 28). Aunado al hecho de que, la activación de Tregs mediada por IL-18 también podría explicar los altos niveles de la IL-17 en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J^{Tg} obesos, pues se ha reportado que las células FoxP3⁺ tienen la capacidad de producir IL-17, mientras que mantienen suprimidas funciones de la respuesta inmune efectora (Figura 22, Figura 23) [239].

Como previamente mencionamos, los ratones C57BL/6J mostraron altos niveles de leptina en suero a pesar de que ganaron el mismo peso que los ratones C57BL/6J^{Tg} (Figura 14-Figura 19). Al cuantificar los niveles de leptina en el tejido adiposo, de igual forma observamos altos niveles en ratones C57BL/6J (Figura 23).

Esto es consistente con el hecho de que la leptina, tiene al parecer un papel dual como hormona y citocina. Hemos visto que como hormona tiene influencia en múltiples funciones endocrinas y del metabolismo energético [240]. Sin embargo, como citocina recientemente se evidenció que promueve respuestas inflamatorias, pues al parecer en pacientes obesos niveles elevados de leptina circulantes contribuyen significativamente al estado inflamatorio por lo que los hace más susceptibles a desarrollar ECV, DM2, o enfermedades degenerativas [219,241,242]. Esto también correlaciona con el hecho de que, en los animales transgénicos obesos, hayamos determinado un ambiente antiinflamatorio en el tejido adiposo, pues detectamos menores niveles de leptina y altos niveles de las citocinas IL-4 e IL-10 (Figura 23).

Con respecto a la metainflamación por la que cursan los animales silvestres en comparación con los animales transgénicos, se ha evidenciado que existen otros receptores citosólicos pertenecientes a la familia NLR los cuales tienen un papel importante en este sentido. Los denominados receptores NOD1 y NOD2 resultan ser receptores citosólicos que pueden desempeñar funciones importantes en la inflamación ocasionada por patógenos, pues tienen la capacidad de inducir una respuesta proinflamatoria al reconocer al ligando peptidoglicano bacteriano (PGN) [243]. Sin embargo, recientemente se ha visto su participación en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo energético.

Zhao y colaboradores [244], mostraron que en ratones alimentados con una dieta alta en grasas se veían incrementados los niveles del mRNA de Nod1 en el tejido adiposo. Esto se asoció con una mayor expresión de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, lo que correlaciono con una disminuida sensibilidad a la insulina y, por tanto, ocasiono alteraciones metabólicas.

Por otro lado, en una línea celular estable de miocitos (L6-GLUT4myc) incubada con PGN activó selectivamente a Nod2, con ello eventualmente se vio inhibida la captación de glucosa por parte de los miocitos, debido a la activación de cinasas proinflamatorias como p-JNK y p38 [245]. Más aun, se ha demostrado que los animales Balb/c deficientes de Nod2 alimentados con una dieta obesogénica no solo generan obesidad, sino que también generan hiperlipidemia e hiperglicemia. Además de sufrir alteraciones en la expresión de genes involucrados en el metabolismo hepático, así como en el

metabolismo y respuesta inmune del tejido adiposo [246]. De manera interesante, también se vio alterada la diversidad de la microbiota intestinal en los animales Balb/c deficientes de Nod2.

Lo sorprendente de los receptores Nod-Nlrp es que, además de tener un papel como receptores inmune innatos intracelulares, al parecer también funcionan como sensores intracelulares y tienen la capacidad de formar complejos. En este sentido, hace tiempo se evidenció la formación del complejo Nod2-Nlrp1b en respuesta al muramil dipéptido, a través del cual se promueve la activación de casp-1 y la producción de IL-1 β [247].

Esto hace pensar que, de existir una interacción entre Nod2 y el inflamasoma Nlrp1b1 en nuestro modelo C57BL/6J^{Tg}, quizás sea la razón por la que evidenciamos mayores niveles de la IL-18. Ya que como hemos visto, los animales Balb/c aun con una dieta obesogénica mostraron una eficiente producción de IL-18 la cual los previno de alteraciones en el metabolismo de lípidos como discutiremos a continuación.

Ratones C57BL/6J^{Tg} mostraron una disminución en el perfil lipídico, a pesar de presentar mayor lipólisis debida a un mayor procesamiento de la IL-18 en su tejido adiposo.

Recientemente se demostró que, a diferencia del inflamasoma Nlrp3 que media la producción de IL-1 β , y así promueve el proceso inflamatorio en el tejido adiposo de animales obesos, la activación del inflamasoma Nlrp1 pudiera mantener la homeostasis de lípidos, y glucosa en respuesta al exceso de energía [199]. Esto involucra a la IL-18, ya que al parecer su producción pudiera ser mediada por el inflamasoma Nlrp1.

De acuerdo con nuestros datos, observamos mayor procesamiento de la IL-18 en los animales C57BL/6J^{Tg}, lo cual también se asoció con una disminuida alteración en su perfil lipídico (Figura 26). Cabe mencionar que, los animales transgénicos además de presentar niveles bajos de colesterol, triglicéridos y LDL (lipoproteínas de baja densidad), estos últimos asociados con un riesgo alto de desarrollar ECV, presentaron mayores niveles de HDL (lipoproteínas de alta densidad) inversamente correlacionados con ECV [248]. Adicionalmente, observamos por medio de micrografías que también los animales transgénicos mostraron menor esteatosis hepática en comparación con los animales silvestres (Figura 27).

Dado que ratones deficientes de IL-18 o del receptor de IL-18 fueron susceptibles a desarrollar hipercolesterolemia [211] y resistencia a la insulina [210], y que incluso, algunos de estos trastornos ocurrieron antes de manifestar obesidad [210]. Mientras que por el contrario, la administración de IL-18 en animales deficientes los rescato de alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa [249]. En este

estudio, identificamos altos niveles de la IL-18 en el tejido adiposo por lo que suponemos que esta citocina pudiera mantener la homeóstasis de este tejido [199,212]. Por ello, proponemos que el incremento de IL-18 en el tejido adiposo resultante de la activación del inflammasoma Nlrp1b1, atenúa las alteraciones metabólicas en nuestro modelo C57BL/6J^{Tg}.

El mecanismo por el cual la IL-18 pudiera promover esta homeóstasis o incluso el gasto energético no está bien definido, pero sabemos que involucra la lipólisis [199]. De acuerdo con esto, decidimos observar los niveles de HSL pues se sabe que es una enzima clave que regula la activación aguda de la lipólisis pues es una proteína citosólica que transloca gotas lipídicas en respuesta a la estimulación por catecolaminas [250]. Dicha translocación depende de la fosforilación por lo que observamos mayores niveles de pHSL^{Ser660} en el tejido adiposo de ratones transgénicos en comparación con los silvestres (Figura 29). Además de que, los animales transgénicos también presentaron menores niveles de perilipina la cual se considera presenta niveles de correlación inversa a los niveles de pHSL^{S600}, pues tiene que ver con la formación de las gotas lipídicas y entre menores sean menores niveles de perilipina se formaran (Figura 29).

Al exponer adipocitos diferenciados 3T3-L1 a la IL-18, también observamos un aumento en los niveles de pHSL^{S660} activa, con lo cual confirmamos que IL-18 promueve la lipólisis (Figura 30). De manera congruente con nuestros datos, encontramos un menor grado de dislipidemia, lo cual correlaciono con una marcada disminución de esteatosis hepática (Figura 26Figura 27) en ratones Balb/c y C57BL/6J^{Tg} obesos.

Por lo que proponemos que el inflammasoma Nlrp1b1 tiene una función protectora contra el desarrollo de la dislipidemia, causada por el exceso de energía, a través de la producción eficiente de IL-18 al promover el retraso de las alteraciones en el metabolismo lipídico. Sin embargo, aun nos hacen falta experimentos por los cuales podríamos determinar como es que la IL-18 podría llevar a la activación de HSL y como esto correlacionaría con una disminuida dislipidemia en los ratones.

La expresión del inflammasoma Nlrp1 en células mieloides no impidió las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos.

El tipo de célula en la que Nlrp1 ejerce su función y procesa a IL-18 bajo un contexto metabólico, aun sigue siendo un área de investigación activa. De acuerdo a la literatura, se ha evidenciado que al hacer trasplante de CMO de ratones deficientes de Nlrp1no se observan cambios en el metabolismo energético al ser alimentados con una dieta obesogénica [199]. Por otro lado, al hacer el mismo tipo de

trasplante en ratones deficientes de Pzd-Card observaron mayor sensibilidad a la insulina en comparación con ratones silvestres luego de haber sido alimentados con una dieta obesogénica [203].

Nosotros en nuestro estudio, no evidenciamos cambios en el peso, así como en el metabolismo de carbohidratos luego de que pasaron 15 semanas de haber realizado el trasplante de CMO y dentro de esas pasaron 10 semanas con una dieta obesogénica (Figura 31-Figura 34). Es probable que se requiera un mayor tiempo con la dieta para poder observar los efectos protectores identificados en los animales transgénicos, ya que de acuerdo a los datos se observa una tendencia a tener mayores niveles de respuesta en la GTT por parte de los ratones trasplantados con células que expresan al *Nlrp1b1*.

SNPs en el gen NLRP1 pudiera tener una participación en la regulación de alteraciones metabólicas en humanos.

A pesar de que los animales transgénicos mostraran menores alteraciones metabólicas y esto correlaciono con que tuvieran menores signos de metainflamación en el tejido adiposo. Esto no impidió que los ratones generaran obesidad, sin embargo, podríamos decir que presentaron un fenotipo similar al “obeso metabólicamente sano”, descrito en algunas personas obesas las cuales no muestran alteraciones metabólicas [221].

Con esta idea, y dado que en humanos solo existe un gen NLRP1, al evaluar la asociación de variantes de un solo nucleótido (SNPs) con alteraciones metabólicas en la población mexicana, se identifico la presencia de la variante rs884367 en el gen NLRP1. Más aun, se le encontró asociada con niveles altos del HDL en personas obesas (datos no mostrados).

De manera inesperada, encontramos que este SNP rs884367 resulto ser silencioso debido a que no genera un cambio de aminoácido en la proteína, por lo que se esperaba que estos polimorfismos no conferirían susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades u otros fenotipos [251]. Sin embargo, recientemente este concepto ha cambiado de acuerdo con algunos ejemplos que daremos a continuación, y en los cuales se discute que dichos SNPs silenciosos pueden tener un papel regulador sobre el mRNA que puede afectar al corte y empalme al aumentar o disminuir su eficiencia, la estabilidad y/o estructura del mRNA. Así mismo, se puede ver afectada la proteína de estos SNPs en su plegamiento, la estructura, como también en su función biológica normal o en su respuesta a cierto tratamiento.

En este sentido, Niemi y colaboradores [223] demostraron la asociación de un SNP sinónimo en el gen *ABCC2* el cual confirió resistencia a múltiples fármacos. De acuerdo con el estudio, los autores observaron un beneficio sistémico por parte del SNP en individuos al tratarlos con pravastatina, el cual pertenece a la familia de las estatinas. En dicho estudio, los autores proponen que el mecanismo

subyacente puede implicar un efecto modulador por parte del SNP sobre la estabilidad del mRNA u otros mecanismos que podrían actuar a nivel transcripcional, aun que no evidenciaron en su estudio su propuesta.

Por otro lado Kimchi y colaboradores [252] reportaron que un SNP sinónimo en el gen de resistencia a múltiples fármacos (*MDR1*), estaba ligado a la función alterada del producto del gen de la P-glicoproteína (P-gp). Ya que, a pesar de que encontraron niveles similares tanto del mRNA como de la proteína P-gp, observaron la inhibición del efecto esperado en células HeLa con el SNP. Por ello, concluyen que existen alteraciones conformacionales que tienen que ver con el plegamiento y la estructura de la proteína P-gp, ya que, resulto en menor actividad de esta proteína ante un inhibidor en comparación con el haplotipo común.

Aun queda por definir si la presencia del SNP rs884367 encontrado en el inflammasoma NLRP1 de individuos en la población mexicana con HDL alto y con obesidad tiene un efecto benéfico. Además de definir cual podría ser el posible(s) mecanismo(s) que posee para conferir dicho efecto, es decir, si este tiene que ver con la estabilidad en la estructura del mRNA o de la proteína del NLRP1, o si existen interacciones a nivel transcripcional los cuales tengan un beneficio sobre mecanismos celulares posiblemente relacionados con los lípidos.

Especulamos que este SNP podría favorecer la estabilidad del mRNA, al favorecer mayores niveles de NLRP1 y, por tanto, promover una mayor producción de la IL-18 en el tejido adiposo de los individuos portadores. Debido a esto, aunque los portadores sean obesos, presentan menores probabilidades de desarrollar alteraciones metabólicas. Sin embargo, aun falta mucho por descubrir con respecto a este SNP silencioso, y su posible papel en el metabolismo energético.

Puntos para destacar en esta tesis y perspectivas.

De acuerdo a la literatura, las alteraciones metabólicas debidas a una condición de obesidad tiene un trasfondo inflamatorio el cual puede ser originado en el tejido adiposo [253]. En este estudio, caracterizamos que la activación del inflammasoma Nlrp1b1 en ratones transgénicos, aminoro las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos a través de modular negativamente la respuesta inflamatoria generada en el tejido adiposo inducida por un exceso de lípidos debido a la DAG.

Demostramos que, la respuesta inflamatoria inducida por la DAG específicamente por las citocinas Casp-1 e IL-1 β se vieran disminuidas, mientras que la IL-18 se vio aumentada en los animales transgénicos. Esto beneficio al metabolismo de lípidos pues se vio disminuida la dislipidemia y se promovió la lipólisis. Sin embargo, ¿cual podría ser el mecanismo por el cual IL-18 beneficia el

metabolismo energético? Y ¿cual podría ser la razón por la que se polariza el fenotipo M1 a un fenotipo M2, resultante de una DAG?

Esto nos dio información para evaluar en una población mestiza mexicana si existían SNPs ligados al inflamasoma NLRP1. De acuerdo al análisis, se identifico un SNP en la población mexicana en cual pudimos ligar a individuos con un IMC alto, pero con parámetros metabólicos cardioprotectores como es altos niveles de HDL. De esta forma, se podría sugerir que existe un posible retardamiento en el desarrollo de alteraciones en el metabolismo de lípidos debido a que prevalece una asociación del SNP en el inflamasoma NLRP1 con mayores niveles de la IL-18. Sin embargo, no es claro cual podría ser la relación entre NLRP1, la IL-18 y el metabolismo de lípidos, por lo que haría falta proponer mas análisis al respecto.

De acuerdo con nuestros datos concluimos que i) la expresión del gen *Nlrp1b1* atenúa las alteraciones metabólicas, y modula la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo, además de promover la lipólisis en respuesta a un exceso calórico, debido a la iii) eficiente producción de la IL-18 producto del gen *Nlrp1b1*. Esto promueve y beneficia diversos mecanismos involucrados en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, que al parecer pueden proteger contra la DM2 y la dislipidemia en animales obesos.

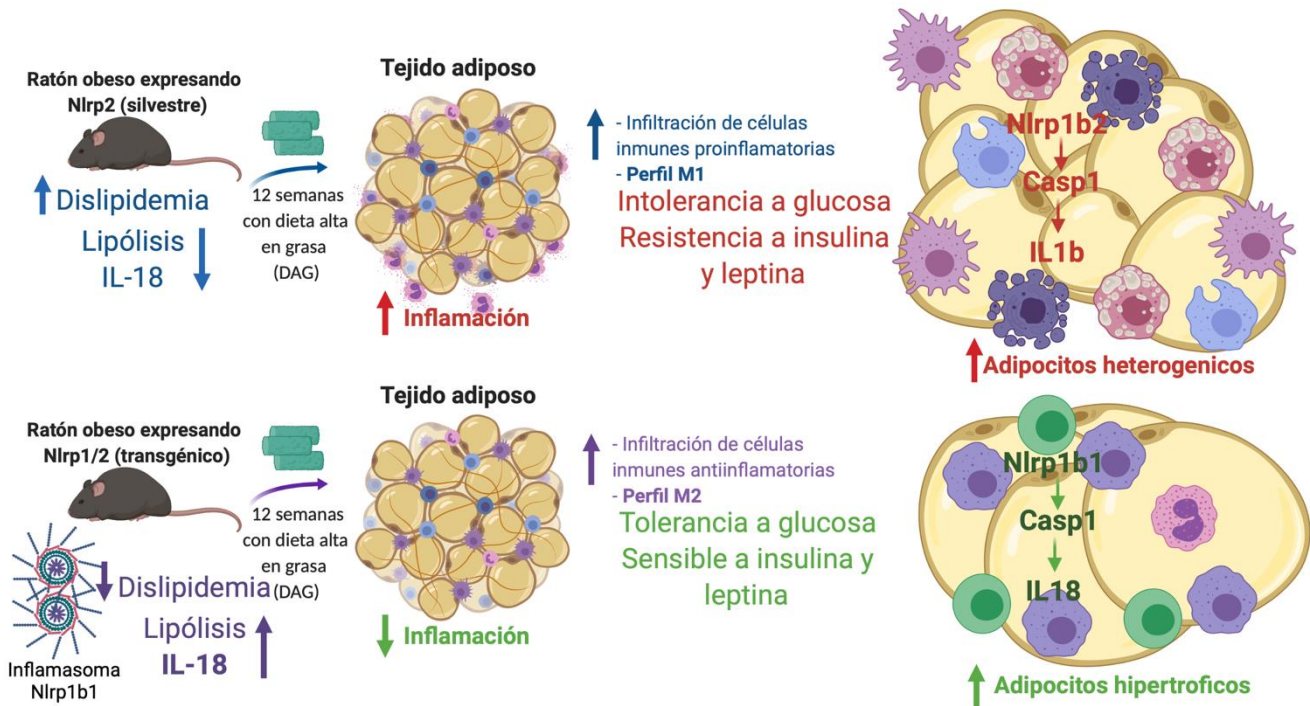


Figura 36. Fenotipo del ratón transgénico obeso metabólicamente sano.

Resumen gráfico el cual recapitula nuestros resultados. De acuerdo a nuestras observaciones en nuestro modelo de ratón transgénico (C57BL/6J^{Tg}) alimentado con una dieta alta en grasa, predominó un fenotipo antiinflamatorio en su tejido adiposo. Esto debido a que se vieron aumentados los niveles de la IL-18 lo cual contribuyó a tener una mejor homeostasis en el metabolismo de glucosa y lípidos.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c obtenidos de Charles River. Los ratones transgénicos C57BL/6J que expresan el alelo *Nlrp1b1* (C57BL/6J^{Tg}), descritos previamente [196], fueron amablemente donados por el Dr. Cory Teuscher de la División de Inmunobiología, Departamento de Medicina, Universidad de Vermont, EE. UU. Las dos líneas independientes de ratones transgénicos C57BL/6J^{Tg} se mantuvieron como heterocigotos, los hermanos de camada negativos para el transgén se utilizaron como animales C57BL/6J silvestres. Todos los animales se mantuvieron en cajas ventiladas, con un ciclo de 12h/12h luz/oscuridad con acceso libre a la alimentación y agua.

Los animales fueron alimentados con una dieta regular (DN) (2018SX; Harlan Teklad Global) o con una dieta alta en grasas (DAG) (D12492, Dietas de investigación, Tabla I) *ad libitum*. El consumo de alimentos y el peso se registraron semanalmente. Todos los experimentos con ratones fueron aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (No de proyecto IN209513 and IN212316), Universidad Nacional Autónoma de México y de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH).

Genotipificación

El DNA genómico se extrajo a partir de un fragmento de la cola del ratón o de la médula ósea para detectar la presencia del gen *Nlrp1b1*. El tejido se digirió en 500 ul de tampón de lisis (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, 4% SDS, 5 mg/ml pronase) en baño maría a 56°C durante la noche. Las muestras se enfriaron en hielo, se añadió RNAsa 5 ul (25 µg) y se incubó a 37°C durante 30 min. El DNA fue precipitado con 200 ul de etanol al 100% y resuspendido en 50 ul de H₂O, cuantificado y almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 20 ng de DNA genómico y 25 pM de oligonucleótidos para: *Nlrp1b1* delantero (TTG ACA GAG AGT GAG GAA CCT ATA CC) y reversa (GGG ACC ATC ATT TGT GGC ATC) durante 35 ciclos (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C, 1,5 min a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 10 min. *Actina* delantero (GGG TCA GAA GGA CTC CTA TG) y reversa (GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG) durante 30 ciclos (45 s a 95°C, 30 s a 60°C, 1 min a 72°C) y una extensión final a 72°C por 7 min. Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizado por tinción con bromuro de etidio.

Análisis metabólico

A todos los animales, previo a las pruebas de tolerancia a glucosa (GTT) y resistencia a insulina (ITT), se les dejó en ayuno por 6 horas y posteriormente, se les determinaron los niveles de glucosa basal (0 min). En el caso de la prueba GTT se les inyectó un bolo de glucosa intraperitonealmente (D-Glucosa; dosis 1.8mg/gr) y se les midieron los niveles de glucosa a través del tiempo (15, 30, 60 y 120 min).

Una semana después, se les realizó la prueba ITT, inyectándoles insulina intraperitonealmente (Humulin R; dosis 0.1 U/gr), y se determinaron los niveles de glucosa en el tiempo (15, 30, 60 y 120 min). Estas mismas pruebas se realizaron nuevamente concluidos los 3 meses de alimentación con las diferentes dietas a todos los animales.

Los niveles de glucosa fueron determinados con el equipo glucómetro Accu-Check Active®, el cual mide por fotometría de reflectancia la intensidad de color producido en la capa de la tira reactiva, una vez que se le deposita una gota de sangre de cada animal. A través de esta reflectancia, calcula la concentración de la muestra a través de un algoritmo específico de lote, y el resultado presentado se describe en unidades de mg/dL o mmol/L.

Para calcular el área bajo la curva (AUC) tanto para GTT como para ITT se utilizó la fórmula de Tai [254]:

$$Area = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n X_{i-1} (Y_{i-1} + Y_i)$$

Donde X_{i-1} = Glucosa (mg / dl), $(Y_{i-1} + Y_i)$ = Tiempo (0,15,30,60,120 min).

Análisis del perfil lipídico

La glucosa plasmática en ayunas (FPG), el colesterol total (CHOD) y los triglicéridos (TG) se determinaron en el suero obtenido de los animales, mediante un ensayo colorimétrico enzimático, utilizando la prueba de glucosa oxidasa y colesterol oxidasa, 4-aminofenazona (kit Roche-Cobas C111, Roche Diagnostic USA). El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 2.5% y 2.8%, respectivamente. Para el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), se midió utilizando métodos enzimáticos directos: PEG colesterol esterasa y PEG colesterol-oxidasa (HDL-C más 3er generación, kit Roche-Cobas C111, Roche Diagnostic USA). El colesterol de baja densidad (LDL-C) se calculó usando los niveles de TG sérico <150.0 mg/dl como se describe en la fórmula de Anandaraja [255].

ELISAS

Los niveles circulantes de insulina y leptina se cuantificaron en suero sanguíneo usando el kit de ELISA para insulina de rata/ratón EMD Millipore (Cat. # EZRMI-13K) y el kit de ELISA para leptina de ratón EMD Millipore (Cat. #EZML-82K), siguiendo las instrucciones de fabricación. Los niveles de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo o en plasma se cuantificaron usando el kit de IL-1 β ELISA MAX™ Deluxe Sets Biolegend (Cat. # 432605) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Activación de macrófagos

Se extrajeron macrófagos de medula a partir de extremidades inferiores de animales de la cepa Balb/c, C57BL/6J y C57BL/6J^{Tg}. Se cultivaron las células de medula ósea para su diferenciación en medio DMEM (GIBCO-Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS products), penicilina (100 ug/ml) -estreptomicina (100 ug/ml, GIBCO-Invitrogen) y glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich). El medio DMEM se suplementó con medio acondicionado L929 al 20% como fuente de estímulo de colonias de granulocitos/macrófagos (GMCSF). Las células se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5%. 48 horas después de sembrar las células 5ml de medio se descartaron y se agregaron 5ml de medio fresco, este paso se repitió 48 horas después. Al día 7, se desechó todo el medio, se lavaron las células con 10 ml de PBS. Se agregaron 2ml de Versene frío (0.48 mM, Thermo Fisher) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células se separaron pipeteando suavemente. Posteriormente, se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio RPMI (GIBCO-Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS products), penicilina (100 ug/ml) -estreptomicina (100 ug/ml, GIBCO-Invitrogen) y glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich). Los macrófagos se contaron y cultivaron en placas 12 horas antes del procedimiento experimental.

Para las diferentes estimulaciones, se sembraron 2x10⁵ macrófagos derivados de médula ósea y se estimularon con la toxina letal ántrax (factor letal 200 ng/ml y antígeno protector 1 μ g/ml) durante 2 horas. Para la estimulación con ATP, glucosa o ácido palmítico, los macrófagos se estimularon previamente con LPS (100 ng/ml) durante 4 horas y luego se expusieron a: ATP (5 mM) durante 2 horas; glucosa (30 mM); sorbitol (30 mM) como control de osmolaridad; albúmina de suero bovino (BSA) con Ac.Pal (ácido palmítico 400 mM, 2% de BSA, 1% de FBS en DMEM) y BSA solo (2% de BSA, 1% de FBS en DMEM) como control, por 24 horas. La desnaturalización de las membranas celulares se obtuvo usando el tensoactivo no ionio Triton® X-100 (9% (v/v en agua) por 45 min. Posterior a los estímulos, los sobrenadantes fueron obtenidos y las células cosechadas y almacenados a -70°C, hasta su procesamiento.

Piroptosis

La actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó en sobrenadantes de cultivos estimulados con los diferentes estímulos como LPS, ATP, glucosa, sorbitol, ácido palmítico y BSA. Como controles se ocuparon sobrenadantes de cultivos estimulados con la toxina letal del ántrax, y en el caso de Triton® X-100 fue para disolver proteínas integrales de membrana. Para ello, se usó el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante y con base en el porcentaje de liberación de LDH de los controles, se determinó el porcentaje de LDH liberado por las condiciones de interés.

Para confirmar las alteraciones en la permeabilidad de la membrana, determinamos el número total de núcleos teñidos con yoduro de propidio. Para la tinción con yoduro de propidio, los macrófagos se lavaron con PBS y se incubaron con yoduro de propidio (5 mg/ml) durante 5 minutos, posteriormente, se realizaron lavados, y fueron fijados con paraformaldehído al 4%, y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Posteriormente se observaron bajo un microscopio invertido Olympus ix8i EP2 refrigerado PE2.

Cultivo y diferenciación de pre adipocitos 3T3-L1

Los pre adipocitos 3T3-L1 fueron donados por el Dr. Ramón González García-Conde (UAEM). Las células 3T3-L1 se mantuvieron de acuerdo a Shing et al., 2010 [256]. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10%, antibiótico al 1%, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y piruvato 25 mM en una atmósfera de CO₂ al 5% 37°C. Un día después de la confluencia, las células 3T3-L1 se diferenciaron en DMEM suplementado con FBS al 10%, insulina 5 µg/ml, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM y dexametasona 1 µM. Dos días después, el medio se reemplazó con medio de cultivo suplementado con 5 µg/ml de insulina y las células se cultivaron por dos días más, cambiando el medio todos los días. En el quinto día de diferenciación, las células se usaron para experimentos.

Antes del tratamiento con rIL-18, las células 3T3-L1 diferenciadas se cambiaron a medio de cultivo en ausencia de agentes diferenciadores. Una hora después, las células se dejaron sin tratar o se trataron con isoproterenol (10 mM) o con rIL-18 (10 ng/ml o 50 ng/ml) durante los períodos de tiempo indicados. Los extractos de proteínas totales se prepararon como se describe a continuación y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Trasplante de células de médula ósea

Se irradiaron ratones C57BL/6J silvestres de 8 semanas de edad con una dosis subletal de 900 rads usando un irradiador de cesio 137 GammaCell-1000E. Posteriormente, los ratones fueron inoculados

vía intravenosa, por la vena de la cola, con células de médula ósea (5×10^5) de ratones C57BL/6J silvestres o C57BL/6J^{Tg}.

Cinco semanas después a la radiación e inoculación de células, los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasas durante diez semanas. Posteriormente, se les realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa (descrito en análisis metabólico). Una vez concluido el experimento, se obtuvo DNA genómico de las células de la médula ósea, para detectar la presencia del transgén *Nlrp1b1*, por medio de PCR, como indicador del éxito del trasplante.

Preparación de tejidos

Luego de ser alimentados por 3 meses con las diferentes dietas, los animales fueron sacrificados con monóxido de carbono (CO₂), previo ayuno de 6 horas. El tejido adiposo retroperitoneal, se fijó en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfatos durante la noche a 4°C, luego se incubó en sacarosa al 30% en PBS durante la noche a 4°C. El hígado fue embebido en tissue Tek® OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) y almacenado a -70°C hasta su uso. El tejido adiposo, músculo e hígado fueron congelados inmediatamente con hielo seco y almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca se mantuvieron a 4°C por aproximadamente dos horas y posteriormente promover la formación de coágulos. Luego, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 10 min; se recuperó el suero y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento.

Para los experimentos en los que se evaluó la activación de la vía de señalización de la insulina, se inyectó a los ratones intraperitonealmente con insulina (Humulin-R®, dosis 0.1 U/gr) y se sacrificaron 15 minutos después.

Análisis histológico del tejido adiposo y hepático

El tejido adiposo se embebió en parafina y se cortó en secciones de 5 µm de espesor. Los cortes fueron puestos al horno a 60°C durante 1 hora, y desparafinados en xileno, posteriormente rehidratados en gradiente de etanoles, y luego teñidos con hematoxilina y eosina (Harris hematoxylin durante 30 s y eosina durante 2 min).

El análisis de la histología de adipocitos se realizó con el software ImageJ de acuerdo con el procedimiento manual (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Las imágenes microscópicas se obtuvieron usando el microscopio confocal Zeiss LSM510 / UV Axiovert 200M con cámara a color Nikon COOLPIX 5000. La infiltración de las células inmunes en el tejido adiposo se cuantificó calculando la proporción de infiltración en 20 campos (20x), de 3 cortes de 5 ratones por grupo experimental. Para el conteo celular

de células inmunes que forman la estructura similar a una corona por mm² se usó el software ImageJ. Se cuantificaron 10 campos (20x y 63x) de 3 cortes de 5 ratones diferentes.

El tejido hepático se montó en el OCT Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se congeló para su corte. Los cortes de hígado se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las imágenes microscópicas se obtuvieron usando el microscopio confocal Zeiss LSM510 / UV Axiovert 200M con cámara a color Nikon COOLPIX 5000. Se cuantificaron 10 campos, 20x de 3 cortes de 3 ratones diferentes.

Inmunofluorescencia

Del tejido adiposo retroperitoneal incluido en parafina, se cortaron secciones (5 µm) y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados (Superfrost Plus Yellow) y se rehidrataron. La recuperación de antígeno inducida por calor se realizó usando tampón de citrato pH 6,0 (citrato de sodio 10 µM) a 90°C durante 20 minutos. Las secciones se permeabilizaron (10 mg/ml de BSA, 5% de suero de caballo, 0,02% de azida de sodio, 0,5% de Triton X-100) durante 2 horas y se incubaron con anti-Ly6G (BD), anti-F4/80 (Abcam) o anticuerpos primarios anti-FoxP3 (Biolegend) a temperatura ambiente durante 18 horas.

Los anticuerpos secundarios anti-rata AF 488 (Molecular Probes), anti-rata AF 594 (Jackson ImmunoResearch) y anti-ratón AF 647 (Jackson ImmunoResearch) respectivamente, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (Invitrogen) durante 10 minutos. Las secciones se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) y se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal invertido Eclipse Nikon Ti (Nikon Corporation) usando NIS Elements v.4.50. Las histografías se analizaron usando el software ImageJ (software ImageJ, National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Extractos proteicos totales e inmunotransferencia

La extracción de proteína total a partir de células, se realizó incubando las células en tampón de lisis (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, β-glicerofosfato 25 mM pH 7.4, PPI_{Na} 2 mM, EDTA 2 mM pH 7.4, Triton X-100 al 1%, 10% de glicerol) suplementado con inhibidor de proteasa completo (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Na₃VO₄ 200 mM, DTT 0.1 mM, PMSF 1 mM), por 10 min. Posteriormente, las células fueron raspadas de la caja para ser lisadas mecánicamente, y todo el concentrado fue centrifugado a 14,500 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se hicieron alícuotas que fueron almacenado a -70°C hasta su procesamiento.

La extracción de proteína total a partir de tejido congelado de hígado, músculo y tejido adiposo, inicio con un fragmento del tejido del tamaño de una lenteja, incubándolo por 10 min en un volumen de entre 300-600 μ L de tampón de lisis . El tejido hepático y músculo y adiposo fueron sonicados con un homogeneizador ultrasónico de sonda (UCE ultrasonic) a una potencia de entre el 50 al 80%, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14,500 rpm por 15 min a 4°C, y se recuperaron los sobrenadantes.

Independientemente del origen de la muestra (células o tejido), las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, y se cargaron 40 μ g de proteína total en geles de acrilamida al 10% (para resolver proteínas >40KDa) o al 15% (para resolver proteínas <30KDa). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.20 μ m), por hora y media.

El bloque de las membranas se realizo por 1 hora, ya sea en leche o BSA al 5% en una solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) con 0.1% de detergente Tween® 20 (TBS-t). Las incubaciones con los anticuerpo primarios fueron realizadas a 4°C toda la noche, diluidos en solución TBS-t. Posterior a la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución TBS-t y se incubo con anticuerpo secundario a temperatura ambiente en solución TBS-t por 1 hora, realizando nuevamente 3 lavados de 10 min cada uno con solución TBS-t. Las interacciones anticuerpo-antígeno se visualizaron por quimioluminiscencia usando un instrumento de biociencias LI-COR. La densitometría se realizó con el software Image Studio versión 5.2.5.

Perfil inflamatorio del tejido adiposo

Para determinar el estado inflamatorio del tejido adiposo de los ratones alimentados con una dieta normal o alta en grasas se determinó mediante la matriz de anticuerpos contra marcadores inflamatorios del ratón C1 RayBio® C-Series (# AAM-INF-1-4). Para ello, se prepararon extractos de proteínas del tejido adiposo como se describió arriba. Las matrices se sondearon con 250 μ g de extractos de proteínas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las interacciones anticuerpo-antígeno se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando un instrumento LI-COR Biosciences. La densitometría se realizó con el software Image Studio versión 5.2.5.

Anticuerpos

Los anticuerpos Anti-AKT fosforilado (Ser 473; No. 9271), anti-AKT (No. 9272), anti-HSL fosforilado (Ser 660; No. 4126), anti-HSL (No. 4107) y anti-perilipina (No. 9349) se obtuvieron de Cell Signaling; los anticuerpos anti-caspasa-1 (sc-514), anti-IL-1 β (sc-1251), anti-ERK fosforilado (#sc-

7383), anti-ERK2 (sc-154), anti-IL-18 (sc-7954) y anti-actina (sc -1615) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media. Los datos se sometieron a ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Turkey, o a la prueba de T de Student, ambas utilizando el gráfico Prism v6. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight. 2021 WHO. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Published 2021.
2. Alasmari HD, Al-Shehri AD, Aljuaid TA, Alzaidi BA, Alswat KA. Relationship Between Body Mass Index and Obesity Awareness in School Students. *J Clin Med Res*. 2017;9(6):520-524. doi:10.14740/jocmr2987w
3. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - Present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):228-236. doi:10.1038/nrendo.2011.183
4. OCDE. Obesidad y economía de la prevención. 2009:8.
5. OECD/EU. Obesity Update 2017. *Diabetologie*. 2017;13(5):331-341. doi:10.1007/s11428-017-0241-7
6. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, Rivera-Dommarco JA. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica Mex*. 2013;55(SUPPL.2):151-160.
7. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, et al. Diseño metodológico de la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino 2016. *Salud Publica Mex*. 2017;59(3):299-305. doi:10.21149/8593
8. Bo S, Musso G, Beccuti G, et al. Consuming more of daily caloric intake at dinner predisposes to obesity. A 6-year population-based prospective cohort study. *PLoS One*. 2014;9(9). doi:10.1371/journal.pone.0108467
9. Dictionary M-W. Disease. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/disease>. Accessed October 16, 2021.
10. MacMahon S, Baigent C, Duffy S, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373(9669):1083-1096. doi:10.1016/S0140-6736(09)60318-4
11. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008;29(7):777-822. doi:10.1210/er.2008-0024
12. Schelbert KB. Comorbidities of Obesity. *Prim Care - Clin Off Pract*. 2009;36(2):271-285. doi:10.1016/j.pop.2009.01.009
13. Pantalone KM, Hobbs TM, Chagin KM, et al. Prevalence and recognition of obesity and its associated comorbidities: Cross-sectional analysis of electronic health record data from a large US integrated health system. *BMJ Open*. 2017;7(11). doi:10.1136/bmjopen-2017-017583
14. Reaven GM. The metabolic syndrome: Time to get off the merry-go-round? *J Intern Med*. 2011;269(2):127-136. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02325.x
15. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7):s176-s185.
16. Mohammad S, Aziz R, Al Mahri S, et al. Obesity and COVID-19: what makes obese host so vulnerable? *Immun Ageing*. 2021;18(1):1-10. doi:10.1186/s12979-020-00212-x
17. Simonnet A, Chetboun M, Poissy J, et al. High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity*. 2020;28(7):1195-1199. doi:10.1002/oby.22831
18. Zhang H, Wang LL, Chen YY, et al. Clinical characteristics of 25 death cases with COVID-19: A retrospective review of medical records in a single medical center, Wuhan, China. *Cancer*. 2020;46(May):1-17. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06023-4>
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.053>
[https://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30310-7](https://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30310-7)
19. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787-835. doi:10.1016/j.mcna.2004.04.013
20. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269-273. doi:10.5001/omj.2012.68
21. Drake AJ, Smith A, Betts PR, Crowne EC, Shield JPH. Type 2 diabetes in obese white children. *Arch Dis Child*. 2002;86(3):207-208. doi:10.1136/ad.86.3.207
22. Copeland KC, Silverstein J, Moore KR, et al. Management of newly diagnosed type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents. *Pediatrics*. 2013;131(2):364-382. doi:10.1542/peds.2012-3494
23. Suckale J. Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Front Biosci*. 2008;Volume(13):7156. doi:10.2741/3218
24. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 2004;490(1-3):5-12. doi:10.1016/j.ejphar.2004.02.040
25. Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab*. 2012;16(6):723-737. doi:10.1016/j.cmet.2012.10.019
26. Chiu SL, Cline HT. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev*. 2010;5(1). doi:10.1186/1749-8104-5-7
27. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39684-39695. doi:10.1074/jbc.M202766200
28. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem*. 1998;182(1-2):31-48.

doi:10.1023/A:1006823109415

29. VANHAESEBROECK B, ALESSI DR. The PI3K–PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000;346(3):561-576. doi:10.1042/bj3460561
30. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* (80-). 2005;307(5712):1098-1101. doi:10.1126/science.1106148
31. Paul C McDonald 1 AOJ MIDMMVGEDWMBBLJFSD. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res.* 2008;68(6):1618-1624. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5869
32. Chen J, Lu Y, Tian M, Huang Q. Molecular mechanisms of foxo1 in adipocyte differentiation. *J Mol Endocrinol.* 2019;62(3):R239-R253. doi:10.1530/JME-18-0178
33. Liu TY, Shi CX, Gao R, et al. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clin Sci.* 2015;129(10):839-850. doi:10.1042/CS20150009
34. H. M. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. 2015;282(November):1318-1321. <https://go-gale-com.cyber.usask.ca/ps/i.do?p=ITOF&u=usaskmain&id=GALE%7CA53588640&v=2.1&it=r>.
35. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006;7(8):606-619. doi:10.1038/nrg1879
36. Mfiinea CP, Sano H, Kane S, et al. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J.* 2005;391(1):87-93. doi:10.1042/BJ20050887
37. Huang S, Czech MP. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* 2007;5(4):237-252. doi:10.1016/j.cmet.2007.03.006
38. McCarthy AM, Elmendorf JS. GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res.* 2007;125(3):373-388.
39. Dimitriadis G, Mitron P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(SUPPL. 1). doi:10.1016/S0168-8227(11)70014-6
40. Ho-Palma AC, Toro P, Rotondo F, et al. Insulin controls triacylglycerol synthesis through control of glycerol metabolism and despite increased lipogenesis. *Nutrients.* 2019;11(3). doi:10.3390/nu11030513
41. Newsholme EA, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(SUPPL. 2). doi:10.1055/s-2001-18575
42. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia.* 2013;56(5):949-964. doi:10.1007/s00125-013-2869-1
43. Alan R. Saltiel and C. Ronald Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(December):1-8. <http://www.medgen.med.umich.edu/labs/saltiel/>.
44. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol.* 2016;231(3):R77-R99. doi:10.1530/JOE-16-0211
45. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients.* 2015;7(11):9453-9474. doi:10.3390/nu7115475
46. Ljungqvist O. Metabolic Regulation: A Human Perspective. *Clin Nutr.* 2011;30(1):133-133. doi:10.1016/j.clnu.2010.12.002
47. Waterson MJ, Horvath TL. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* 2015;22(6):962-970. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.026
48. Coll AP, Yeo GSH. The hypothalamus and metabolism: Integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(6):970-976. doi:10.1016/j.coph.2013.09.010
49. Dietrich MO, Horvath TL. Hypothalamic control of energy balance: Insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2013;36(2):65-73. doi:10.1016/j.tins.2012.12.005
50. Morton GJ, Schwartz MW. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev.* 2011;91(2):389-411. doi:10.1152/physrev.00007.2010
51. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: A review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(5):620-630. doi:10.1111/nmo.12754
52. Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(8):362-369. doi:10.1016/j.tem.2004.07.009
53. Khanh D V., Choi YH, Moh SH, Kinyua AW, Kim KW. Leptin and insulin signaling in dopaminergic neurons: Relationship between energy balance and reward system. *Front Psychol.* 2014;5(AUG). doi:10.3389/fpsyg.2014.00846
54. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep.* 2015;48(4):229-233. doi:10.5483/BMBRep.2015.48.4.272
55. Berglund ED, Vianna CR, Donato J, et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(3):1000-1009. doi:10.1172/JCI59816
56. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats. *Diabetes.* 2001;50(7-12):2438-2443. doi:10.2337/diabetes.50.11.2438

57. Kohno D, Yada T. Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides*. 2012;46(6):315-319. doi:10.1016/j.npep.2012.09.004
58. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003;37(4):649-661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1
59. Lv Y, Liang T, Wang G, Li Z. Ghrelin, A gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Biosci Rep*. 2018;38(5). doi:10.1042/BSR20181061
60. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212(1):E1-E19. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x
61. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*. 2015;64(1):131-145. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.016
62. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146(10):4192-4199. doi:10.1210/en.2004-1520
63. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009;296(5). doi:10.1152/ajpendo.90377.2008
64. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32324-32332. doi:10.1074/jbc.M111.254417
65. Purkayastha S, Zhang G, Cai D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. *Nat Med*. 2011;17(7):883-887. doi:10.1038/nm.2372
66. Ni Y, Zhao L, Yu H, et al. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1513-1522. doi:10.1016/j.ebiom.2015.09.004
67. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: An endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;26(1):25-42. doi:10.1515/hmbci-2015-0073
68. Spiegelman EDR and BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847-853. doi:10.1038/nature05483.Adipocytes
69. Verboven K, Wouters K, Gaens K, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-22962-x
70. Jensen MD, Kirkland JL. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. 2014;17(5):644-656. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008.Mechanisms
71. Shah BR, Hux JE. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(2):510-513. doi:10.2337/diacare.26.2.510
72. Ellulu MS, Patimah I, Khaza' ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Arch Med Sci*. 2017;13(4):851-863. doi:10.5114/aoms.2016.58928
73. Jo J, Gavrilova O, Pack S, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3). doi:10.1371/journal.pcbi.1000324
74. Arner E, Westermarck PO, Spalding KL, et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105-109. doi:10.2337/db09-0942
75. Olga T. Hardya, b, Richard A. Peruginic, Sarah M. Nicoleroa, Karen Gallagher-Dorvalc, Vishwajeet Puria, Juerg Straubhaara and MPC. BMI-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. 2012;7(1):60-67. doi:10.1016/j.soard.2010.05.013.BMI-independent
76. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56(12):2910-2918. doi:10.2337/db07-0767
77. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200
78. Lindhorst A, Raulien N, Wieghofer P, et al. Adipocyte death triggers a pro-inflammatory response and induces metabolic activation of resident macrophages. *Cell Death Dis*. 2021;12(6):1-15. doi:10.1038/s41419-021-03872-9
79. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020;15:493-518. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847
80. Wen H, Gris D, Lei Y, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12(5):408-415. doi:10.1038/ni.2022
81. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 2010;11(2):136-140. doi:10.1038/ni.1831
82. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228-232. doi:10.1038/nature04515
83. Vandanmagsar B, Youm Y, Ravussin A, et al. The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Insulin*. 2011;17(2):179-188. doi:10.1038/nm.2279.The
84. Dwevel P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature*. 2010;464(7293):1357-1361. doi:10.1038/nature08938.NLRP3

85. Youm Y, Kanneganti T, Vandanmagsar B, et al. The NLRP3 Inflammasome Promotes Age-related Thymic Demise and Immunosenescence. *Cell Rep.* 2012;1(1):1-22. doi:10.1016/j.celrep.2011.11.005.
86. Appari M, Channon KM, McNeill E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. *Antioxidants Redox Signal.* 2018;29(3):297-312. doi:10.1089/ars.2017.7060
87. Raje V, Ahern KW, Martinez BA, et al. Adipocyte lipolysis drives acute stress - induced insulin resistance. *Sci Rep.* 2020;1-13. doi:10.1038/s41598-020-75321-0
88. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-867. doi:10.1038/nature05485
89. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. In: *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes.* Vol 107. ; 1999:119-125. doi:10.1055/s-0029-1212086
90. Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes.* 2011;60(3):797-809. doi:10.2337/db10-0705
91. Grant R, Youm Y-H, Ravussin A, Dixit VD. Quantification of Adipose Tissue Leukocytosis in Obesity. In: *Methods Mol Biol.* ; 2013:195-209. doi:10.1007/978-1-62703-523-1_15
92. Miao EA, Rajan J V., Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011;243(1):206-214. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
93. Mirea AM, Stienstra R, Kanneganti TD, et al. Mice Deficient in the IL-1 β Activation Genes Prtn3, Elane, and Casp1 Are Protected Against the Development of Obesity-Induced NAFLD. *Inflammation.* 2020;43(3):1054-1064. doi:10.1007/s10753-020-01190-4
94. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99-109. doi:10.1038/nrmicro2070
95. Giordano A, Murano I, Mondini E, et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res.* 2013;54(9):2423-2436. doi:10.1194/jlr.M038638
96. Martinon F, Burns K, Tschoop J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417-426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
97. Iwasaki Y, Suganami T, Hachiya R, et al. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes.* 2014;63(1):152-161. doi:10.2337/db13-0757
98. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010;12(6):593-605. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.011
99. Kabayama K, Sato T, Kitamura F, et al. TNF α -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: Involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology.* 2005;15(1):21-29. doi:10.1093/glycob/cwh135
100. Castoldi A, De Souza CN, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol.* 2016;6(JAN). doi:10.3389/fimmu.2015.00637
101. Lee YH, Petkova AP, Granneman JG. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metab.* 2013;18(3):355-367. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.003
102. Arner P, Bernard S, Appelsved L, et al. Adipose lipid turnover and long-term changes in body weight. *Nat Med.* 2019;25(9):1385-1389. doi:10.1038/s41591-019-0565-5
103. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* 2008;49(7):1562-1568. doi:10.1194/jlr.M800019-JLR200
104. John R, Giudicessi BA, Michael J, Ackerman. 2013. Adipose tissue as an immunological organ. *Bone.* 2015;23(1):1-7. doi:10.1038/jid.2014.371
105. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia.* 2016;59(5):879-894. doi:10.1007/s00125-016-3904-9
106. Lu J, Zhao J, Meng H, Zhang X. Adipose tissue-resident immune cells in obesity and type 2 diabetes. *Front Immunol.* 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.01173
107. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, et al. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature.* 2000;407(6801):202-207. doi:10.1038/35025089
108. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(7-8):873-891. doi:10.1007/s00018-007-6359-9
109. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* 2004;17(3):183-190. doi:10.2337/diaspect.17.3.183
110. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2010;375(9710):181-183. doi:10.1016/S0140-6736(09)61794-3
111. Shin JA, Lee JH, Lim SY, et al. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig.* 2013;4(4):334-343. doi:10.1111/jdi.12075
112. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* 2018;36(1):14-20. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004
113. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808. doi:10.1172/JCI200319246

114. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85-96. doi:10.1038/nrm1837
115. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 2001;15(12):2099-2111. doi:10.1096/fj.01-0009rev
116. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007;148(1):241-251. doi:10.1210/en.2006-0692
117. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2002;283(3 46-3). doi:10.1152/ajpendo.00514.2001
118. Boucher J, Kleinridders A, Ronald Kahn C. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1). doi:10.1101/cshperspect.a009191
119. Ye J. Role of Insulin in the Pathogenesis of Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Endocrine, Metab Immune Disord Targets.* 2012;7(1):65-74. doi:10.2174/187153007780059423
120. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14(3-4):222-231. doi:10.2119/2007-00119.Tilg
121. Akash MSH, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem.* 2013;114(3):525-531. doi:10.1002/jcb.24402
122. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107. doi:10.1038/nri2925
123. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-).* 1993;259(5091):87-91. doi:10.1126/science.7678183
124. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature.* 1997;389(6651):610-614. doi:10.1038/39335
125. Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science (80-).* 2002;296(5573):1634-1635. doi:10.1126/science.1071924
126. Wueest S, Konrad D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2020;319(3):E607-E613. doi:10.1152/ajpendo.00306.2020
127. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97. doi:10.1038/nri2921
128. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res.* 2001;9(7):414-417. doi:10.1038/oby.2001.54
129. Bastard J-P, Jardel C, Bruckert E, et al. Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after Weight Loss*. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(9):3338-3342. doi:10.1210/jcem.85.9.6839
130. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J.* 2003;17(8):1-10. doi:10.1096/fj.02-0670fje
131. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(16):13740-13746. doi:10.1074/jbc.M210689200
132. Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3005-3010. doi:10.1210/jc.2002-021687
133. Kaplan JL, Marshall MA, McSkimming CC, et al. Adipocyte progenitor cells initiate monocyte chemoattractant protein-1-mediated macrophage accumulation in visceral adipose tissue. *Mol Metab.* 2015;4(11):779-794. doi:10.1016/j.molmet.2015.07.010
134. Ota T. Chemokine systems link obesity to insulin resistance. *Diabetes Metab J.* 2013;37(3):165-172. doi:10.4093/dmj.2013.37.3.165
135. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-1505. doi:10.1172/JCI26498
136. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-124. doi:10.1172/JCI24335
137. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26602-26614. doi:10.1074/jbc.M601284200
138. Febbraio MA. Role of interleukins in obesity: Implications for metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(6):312-319. doi:10.1016/j.tem.2014.02.004
139. Lawrence MC, McGlynn K, Park BH, Cobb MH. ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26751-26759. doi:10.1074/jbc.M503158200
140. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes.

- Science* (80-). 2004;306(5695):457-461. doi:10.1126/science.1103160
141. Shi H, Kokoeva M V., Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015-3025. doi:10.1172/JCI28898
 142. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2004;18(8):2024-2034. doi:10.1210/me.2003-0383
 143. Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50230-50236. doi:10.1074/jbc.M200958200
 144. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1679-1689. doi:10.1172/JCI30565
 145. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):2992-3002. doi:10.1172/JCI34260
 146. Blouin CM, Prado C, Takane KK, et al. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes.* 2010;59(3):600-610. doi:10.2337/db09-0897
 147. Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding to the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC -Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7794-7808. doi:10.1128/mcb.23.21.7794-7808.2003
 148. Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide Mediates Insulin Resistance by Tumor Necrosis Factor- α in Brown Adipocytes by Maintaining Akt in an Inactive Dephosphorylated State. *Diabetes.* 2001;50(7-12):2563-2571. doi:10.2337/diabetes.50.11.2563
 149. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2007;5(3):167-179. doi:10.1016/j.cmet.2007.01.002
 150. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-1119. doi:10.1172/JCI200525102
 151. Storgaard H, Song XM, Jensen CB, et al. Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001;50(12):2770-2778. doi:10.2337/diabetes.50.12.2770
 152. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3). doi:10.1530/JME-13-0277
 153. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010;375(9733):2215-2222. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9
 154. Teng KT, Chang CY, Chang LF, Nesaretnam K. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: Mechanisms and clinical evidence. *Nutr J.* 2014;13(1):1-15. doi:10.1186/1475-2891-13-12
 155. Könnner AC, Brüning JC. Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(1):16-23. doi:10.1016/j.tem.2010.08.007
 156. Kaparakis M, Philpott DJ, Ferrero RL. Mammalian NLR proteins; discriminating foe from friend. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(6):495-502. doi:10.1038/sj.icb.7100105
 157. Saxena M, Yeretssian G. NOD-like receptors: Master regulators of inflammation and cancer. *Front Immunol.* 2014;5(JUL). doi:10.3389/fimmu.2014.00327
 158. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Med J.* 2016;57(1):5-14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
 159. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
 160. Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* 2009;19(9):455-464. doi:10.1016/j.tcb.2009.06.002
 161. Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, et al. Priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation in human monocytes. *Front Immunol.* 2020:1-14. doi:10.1101/2020.01.30.925248
 162. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol.* 2009;183(2):787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
 163. Martel J, Lai HC, Ko YF, Young JD, Ojcius DM. Alternative functions for the multifarious inflammasome. *Biomed J.* 2016;39(3):183-187. doi:10.1016/j.bj.2016.06.001
 164. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014;157(5):1013-1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007
 165. Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *J Biol Chem.* 2012;287(50):41732-41743. doi:10.1074/jbc.M112.381228
 166. Proell M, Gerlic M, Mace PD, Reed JC, Riedl SJ. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. *Biochem J.* 2013;449(3):613-621. doi:10.1042/BJ20121198
 167. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.*

- 2009;27(1):519-550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
168. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, et al. Caspase-1 activation of IL-1 β and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*. 2000;12(5):581-590. doi:10.1016/S1074-7613(00)80209-5
 169. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: Is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis*. 2012;3(7). doi:10.1038/cddis.2012.86
 170. Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: Inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol*. 2013;4(MAR). doi:10.3389/fimmu.2013.00050
 171. Goossens GH, Blaak EE, Theunissen R, et al. Expression of NLRP3 inflammasome and T cell population markers in adipose tissue are associated with insulin resistance and impaired glucose metabolism in humans. *Mol Immunol*. 2012;50(3):142-149. doi:10.1016/j.molimm.2012.01.005
 172. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-1361. doi:10.1038/nature08938
 173. Bando S, Fukuda D, Soeki T, et al. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):407-414. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.043
 174. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179-189. doi:10.1038/nm.2279
 175. Stienstra R, Van Diepen JA, Tack CJ, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15324-15329. doi:10.1073/pnas.1100255108
 176. Wen H, Ting JPY, O'Neill LAJ. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases - Did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol*. 2012;13(4):352-357. doi:10.1038/ni.2228
 177. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-150. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
 178. Rheinheimer J, de Souza BM, Cardoso NS, Bauer AC, Crispim D. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism*. 2017;74:1-9. doi:10.1016/j.metabol.2017.06.002
 179. Esser N, L'Homme L, De Roover A, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia*. 2013;56(11):2487-2497. doi:10.1007/s00125-013-3023-9
 180. Kursawe R, Dixit VD, Scherer PE, et al. A role of the inflammasome in the low storage capacity of the abdominal subcutaneous adipose tissue in obese adolescents. *Diabetes*. 2016;65(3):610-618. doi:10.2337/db15-1478
 181. Youm YH, Grant RW, McCabe LR, et al. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab*. 2013;18(4):519-532. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.010
 182. Pavillard LE, Cañadas-Lozano D, Alcocer-Gómez E, et al. NLRP3-inflammasome inhibition prevents high fat and high sugar diets-induced heart damage through autophagy induction. *Oncotarget*. 2017;8(59):99740-99756. doi:10.18632/oncotarget.20763
 183. Xu C, Lu Z, Luo Y, et al. Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-06522-5
 184. Kimura H, Karasawa T, Usui F, et al. Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2016;311(5):E881-E890. doi:10.1152/ajpendo.00174.2016
 185. Youm YH, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology*. 2011;152(11):4039-4045. doi:10.1210/en.2011-1326
 186. Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. *Front Pharmacol*. 2015;6(NOV). doi:10.3389/fphar.2015.00262
 187. Wu KKL, Cheung SWM, Cheng KKY. NLRP3 inflammasome activation in adipose tissues and its implications on metabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):1-22. doi:10.3390/ijms21114184
 188. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science (80-)*. 2010;327(5963):296-300. doi:10.1126/science.1184003
 189. Clee SM, Attie AD. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev*. 2007;28(1):48-83. doi:10.1210/er.2006-0035
 190. Waller-Evans H, Hue C, Fearnside J, et al. Nutrigenomics of high fat diet induced obesity in mice suggests relationships between susceptibility to fatty liver disease and the proteasome. *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0082825
 191. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013;56(5):1129-1139. doi:10.1007/s00125-013-2846-8
 192. Nishikawa S, Sugimoto J, Okada M, Sakairi T, Takagi S. Gene Expression in Livers of BALB/C and C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet. *Toxicol Pathol*. 2012;40(1):71-82. doi:10.1177/0192623311422078
 193. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2005;48(4):675-686. doi:10.1007/s00125-005-1680-z

194. Mekada K, Abe K, Murakami A, et al. Genetic differences among C57BL/6J substrains. *Exp Anim*. 2009;58(2):141-149. doi:10.1538/expanim.58.141
195. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 2006;55(7):2153-2156. doi:10.2337/db06-0358
196. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*. 2006;38(2):240-244. doi:10.1038/ng1724
197. Sastalla I, Crown D, Masters SL, McKenzie A, Leppla SH, Moayeri M. Transcriptional analysis of the three Nlrp1 paralogs in mice. *BMC Genomics*. 2013;14(1). doi:10.1186/1471-2164-14-188
198. Moayeri M, Crown D, Newman ZL, et al. Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment. *PLoS Pathog*. 2010;6(12). doi:10.1371/journal.ppat.1001222
199. Murphy AJ, Kraakman MJ, Kammoun HL, et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2016;23(1):155-164. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.024
200. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517-1526. doi:10.1056/nejmoa065213
201. Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851-860. doi:10.1172/JCI200215318
202. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, et al. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*. 2006;49(9):2162-2173. doi:10.1007/s00125-006-0335-z
203. Wen H, Gris D, Lei Y, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12(5):408-415. doi:10.1038/ni.2022
204. Palomera L, Gómez-Arauz A, Villanueva-Ortega E, Meléndez-Mier G, Islas-Andrade S, Escobedo G. Serum levels of interleukin-1 beta associate better with severity of simple steatosis than liver function tests in morbidly obese patients. *J Res Med Sci*. 2018;23(1). doi:10.4103/jrms.JRMS_142_18
205. Thomassen E, Bird TA, Renshaw BR, Kennedy MK, Sims JE. Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1. *J Interf Cytokine Res*. 1998;18(12):1077-1088. doi:10.1089/jir.1998.18.1077
206. Seki E, Tsutsui H, Nakano H, et al. Lipopolysaccharide-Induced IL-18 Secretion from Murine Kupffer Cells Independently of Myeloid Differentiation Factor 88 That Is Critically Involved in Induction of Production of IL-12 and IL-1 β . *J Immunol*. 2001;166(4):2651-2657. doi:10.4049/jimmunol.166.4.2651
207. Bruun JM, Stallknecht B, Helge JW, Richelsen B. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: Effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(4):465-471. doi:10.1530/EJE-07-0206
208. Fischer CP, Perstrup LB, Berntsen A, Eskildsen P, Pedersen BK. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol*. 2005;117(2):152-160. doi:10.1016/j.clim.2005.07.008
209. Yang YS, Li XY, Hong J, et al. Interleukin-18 enhances glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine*. 2007;32(3):297-302. doi:10.1007/s12020-008-9048-z
210. Netea MG, Joosten LAB, Lewis E, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med*. 2006;12(6):650-656. doi:10.1038/nm1415
211. Yamanishi K, Maeda S, Kuwahara-Otani S, et al. Interleukin-18–deficient mice develop dyslipidemia resulting in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Transl Res*. 2016;173:101-114.e7. doi:10.1016/j.trsl.2016.03.010
212. Zorrilla EP, Conti B. Interleukin-18 null mutation increases weight and food intake and reduces energy expenditure and lipid substrate utilization in high-fat diet fed mice. *Brain Behav Immun*. 2014;37:45-53. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.001
213. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*. 2002;106(1):24-30. doi:10.1161/01.CIR.0000020546.30940.92
214. Jefferis BJMH, Papacosta O, Owen CG, et al. Interleukin 18 and coronary heart disease: Prospective study and systematic review. *Atherosclerosis*. 2011;217(1):227-233. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.015
215. Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, et al. Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: Results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2745-2751. doi:10.1161/01.ATV.0000248096.62495.73
216. Yamanishi K, Maeda S, Kuwahara-Otani S, et al. Deficiency in interleukin-18 promotes differentiation of brown adipose tissue resulting in fat accumulation despite dyslipidemia. *J Transl Med*. 2018;16(1). doi:10.1186/s12967-018-1684-3
217. Bouchard C. Gene-environment interactions in the etiology of obesity: Defining the fundamentals. *Obesity*. 2008;16(SUPPL. 3). doi:10.1038/oby.2008.528
218. Wang B, Chandrasekera P, Pippin J. Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(2):131-145. doi:10.2174/1573399810666140508121012

219. la Cava A. Proinflammatory activities of leptin in non-autoimmune conditions. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2012;11(4):298-302. doi:10.2174/187152812800959031
220. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(APR):1-16. doi:10.3389/fendo.2016.00030
221. Blüher M. Metabolically healthy obesity. *Endocr Rev*. 2020;41(3):405-420. doi:10.1210/endo/bnaa004
222. Ramirez-Garcia SA, Charles-Niño C, Mazariegos-Rubí M, et al. Association of the ELMO1 gene (Snp rs1345365) with development of type 2 diabetes mellitus in the mexican mestizo population. *Investig Clin*. 2015;56(4):341-355.
223. Niemi M, Arnold KA, Backman JT, et al. Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(11):801-808. doi:10.1097/01.fpc.0000230422.50962.91
224. Estrada K, Aukrust I, Bjørkhaug L, et al. Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a latino population the SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2014;311(22):2305-2314. doi:10.1001/jama.2014.6511
225. Virtue S, Vidal-Puig A. GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nat Metab*. 2021:1-4. doi:10.1038/s42255-021-00414-7
226. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: Implications for care. In: *Diabetes Care*. Vol 30. ; 2007:753-759. doi:10.2337/dc07-9920
227. Inui A, Tsai M, Amitani H, Asakawa A. Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(9):543. doi:10.4103/2230-8210.105570
228. Seufert J. Leptin Effects on Pancreatic β -Cell Gene Expression and Function. In: *Diabetes*. Vol 53. ; 2004. doi:10.2337/diabetes.53.2007.s152
229. Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092358
230. Jo J, Gavrilova O, Pack S, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3). doi:10.1371/journal.pcbi.1000324
231. Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. *Obesity*. 2016;24(3):597-605. doi:10.1002/oby.21377
232. Menzies-Gow A, Ying S, Sabroe I, et al. Eotaxin (CCL11) and Eotaxin-2 (CCL24) Induce Recruitment of Eosinophils, Basophils, Neutrophils, and Macrophages As Well As Features of Early- and Late-Phase Allergic Reactions Following Cutaneous Injection in Human Atopic and Nonatopic Volunteers. *J Immunol*. 2002;169(5):2712-2718. doi:10.4049/jimmunol.169.5.2712
233. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. In: *Cell Research*. Vol 16. ; 2006:126-133. doi:10.1038/sj.cr.7310017
234. Hoelzinger DB, Smith SE, Mirza N, Dominguez AL, Manrique SZ, Lustgarten J. Blockade of CCL1 Inhibits T Regulatory Cell Suppressive Function Enhancing Tumor Immunity without Affecting T Effector Responses. *J Immunol*. 2010;184(12):6833-6842. doi:10.4049/jimmunol.0904084
235. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al. A Special Population of regulatory T Cells Potentiates muscle repair. *Cell*. 2013;155(6). doi:10.1016/j.cell.2013.10.054
236. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8(2):191-197. doi:10.1038/ni1428
237. Zeiser R, Zambricki EA, Leveson-Gower D, Kambham N, Beilhack A, Negrin RS. Host-Derived Interleukin-18 Differentially Impacts Regulatory and Conventional T Cell Expansion During Acute Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(12):1427-1438. doi:10.1016/j.bbmt.2007.08.041
238. Arpaia N, Green JA, Moltedo B, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell*. 2015;162(5):1078-1089. doi:10.1016/j.cell.2015.08.021
239. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 2009;113(18):4240-4249. doi:10.1182/blood-2008-10-183251
240. Wrann CD, Rosen ED. New insights into adipocyte-specific leptin gene expression. *Adipocyte*. 2012;1(3):168-172. doi:10.4161/adip.20574
241. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*. 2017;98:51-58. doi:10.1016/j.cyto.2016.10.011
242. Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1078-1089. doi:10.1016/j.bbdis.2016.08.018
243. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, et al. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem*. 2003;278(43):41702-41708. doi:10.1074/jbc.M307198200
244. Zhao L, Hu P, Zhou Y, Purohit J, Hwang D. NOD1 activation induces proinflammatory gene expression and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2011;301(4). doi:10.1152/ajpendo.00709.2010
245. Tamrakar AK, Schertzer JD, Chiu TT, et al. NOD2 activation induces muscle cell-autonomous innate immune responses and insulin resistance. *Endocrinology*. 2010;151(12):5624-5637. doi:10.1210/en.2010-0437
246. Rodriguez-Nunez I, Caluag T, Kirby K, Rudick CN, Dziarski R, Gupta D. Nod2 and Nod2-regulated microbiota

- protect BALB/c mice from diet-induced obesity and metabolic dysfunction. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-00484-2
247. Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(22):7803-7808. doi:10.1073/pnas.0802726105
248. Zhao L, Ni Y, Ma X, et al. A panel of free fatty acid ratios to predict the development of metabolic abnormalities in healthy obese individuals. *Sci Rep.* 2016;6(June):1-9. doi:10.1038/srep28418
249. Lindegaard B, Matthews VB, Brandt C, et al. Interleukin-18 activates skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice. *Diabetes.* 2013;62(9):3064-3074. doi:10.2337/db12-1095
250. Martin S, Okano S, Kistler C, Fernandez-Rojo MA, Hill MM, Parton RG. Spatiotemporal regulation of early lipolytic signaling in adipocytes. *J Biol Chem.* 2009;284(46):32097-32107. doi:10.1074/jbc.M109.002675
251. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex.* 2013;149(2):220-228.
252. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (80-).* 2007;315(5811):525-528. doi:10.1126/science.1135308
253. Fu S, Yang L, Li P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 2011;473(7348):528-531. doi:10.1038/nature09968
254. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care.* 1994;17(2):152-154. doi:10.2337/diacare.17.2.152
255. Gazi I, Tsimihodimos V, Filippatos TD, et al. LDL cholesterol estimation in patients with the metabolic syndrome. *Lipids Health Dis.* 2006;5:1-2. doi:10.1186/1476-511X-5-8
256. Shin E, Choi KM, Yoo HS, Lee CK, Hwang BY, Lee MK. Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *fraxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(9):1610-1614. doi:10.1248/bpb.33.1610