



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

**MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A
LA INSULINA POR EL ÁCIDO PALMÍTICO EN NEURONAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. EN PSIC. KARINA SÁNCHEZ ALEGRÍA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MARZO 2022



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 proyecto se realizó en el laboratorio C-210 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría de la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez. El desarrollo del proyecto tuvo el apoyo financiero del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA IN202318 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S9559. Karina Sánchez Alegría contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 597751.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por haber sido mi hogar académico desde los quince años. Siempre será un gran orgullo pertenecer a su comunidad.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Por formarme en el área científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Por la beca otorgada durante mis estudios de Posgrado (597751).

A mi tutora principal Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez. Por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por su guía en mi formación científica, por compartirme de sus conocimientos y por todas esas pláticas que me edificaron personal y académicamente. Por retarme a crecer, por inspirarme y contagiarme de su pasión. Gracias.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Marina Macías Silva y el Dr. Luis B. Tovar y Romo, por todos sus comentarios que edificaron mi proyecto de tesis, por su compromiso y profesionalismo al ejercer su tutoría. Gracias Dra. Marina, por proporcionarme siempre un ambiente cálido y muy edificante. Terminé el Doctorado con una muy grata experiencia en cuanto a mi tutoría, gracias a ambos.

A la Dra. Angélica Zepeda, por sus aportaciones y todas las pláticas que me edificaron profesional y personalmente.

A la Q.F.B. Patricia Ferrera, por su apoyo técnico en el laboratorio y en el manejo de la línea celular del neuroblastoma humano, MSN.

Al Dr. Luis Vaca, por permitirme realizar los experimentos de medición de Ca^{2+} en su laboratorio. Gracias por su apoyo y todas sus aportaciones para este proyecto.

Al Dr. Carlos Ernesto Bastián Eugenio, por toda su colaboración en la parte de medición de Ca^{2+} . Por tus enseñanzas en la realización de los experimentos, la microscopía y el análisis de datos. Gracias por tu compromiso, por dedicar varios fines de semana a este trabajo, por tu paciencia y por hacerme pasar momentos tan gratos y divertidos con tus pláticas mientras se hacían los registros.

A la Dra. Alicia Sampieri, por su apoyo técnico en la realización de los experimentos de Ca^{2+} .

A todos los miembros del laboratorio C-210: Manu, Liz, Abril, Gibrán, Eva, Nelly, César, Sina, Iker, Andrea, Denisse, Eduardo, Brandon, Isela y Eli por sus enseñanzas, por las experiencias compartidas, las risas, los momentos de edificación académica y de recreación. Gracias por siempre crear un ambiente de familia que hacía mucho más ligero el estrés que se pudiera tener en un posgrado.

Gracias en especial a Kari, Marthis y Vale, por esas tardes de risas, las bromas, el apoyo, las tardes de café y disertación filosófica como diría la querida Marthis. El corazón se me llena de alegría por la amistad construida, las quiero y las admiro.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Rufina Alegría y Antonio Sánchez. Por todo su amor, apoyo, motivación y edificación. Lo que soy es reflejo de su esfuerzo y compromiso como padres. Ustedes son mi admiración y me alegra que pueda honrarlos de igual manera con frutos de mi esfuerzo. Siempre les dedicaré cada logro que obtenga. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Hugo, Nancy y Mónica. Por su amor, apoyo y complicidad. Por ser ejemplo de esfuerzo, constancia y perseverancia. Crecer junto a ustedes es lo mejor que me ha pasado. Gracias por las pláticas y las reuniones familiares, siempre dan fuerza en momentos difíciles. Los amo.

A Adiel y mis hermosos sobrinos, Gisela y Leonel. Por ser parte de mi núcleo y alegrarme con sus vidas. Mis queridos sobrinos, gracias por retarme a ser mejor persona, por alimentarme con su cariño y motivarme con sus bellas palabras. No importa cuánto crezcan, siempre serán mis pequeñitos bebés. La evolución de sus mentes y criterio como nueva generación da esperanza a la humanidad. Los amo y admiro.

A mis amigas Irazema, Claudia, Lorena, Marlene, Karina y Montse por todo el camino recorrido. Su amistad siempre será refugio y lugar de recarga para continuar creciendo. Las adoro.

A Emilio Mendoza, mi gran amigo. Gracias por todo tu apoyo, por las pláticas, las motivaciones dadas, por tu hombro, por las risas y las bellas experiencias. Es un honor seguir avanzando con tu amistad. Vamo' a darle.

A Carlos Fletcher. Por todo tu apoyo, tu amor y comprensión. Gracias por ser los brazos a donde puedo descansar, por cada momento y por la vida construida. Las palabras no alcanzan para expresarte mi gratitud. Te quiero con toda mi alma.

***Con todo mi amor para ti,
mi querido Joshua.***

Mi co-autor del anonimato.

Mi inspiración.

Mi fuerza.

Mi gran amor.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Consumo de dietas altas en grasa y su efecto en el Sistema Nervioso Central.	10
2.2 Recaptura de ácidos grasos en el cerebro.	11
2.3 ¿Las neuronas pueden metabolizar ácidos grasos?	13
2.4 El ácido palmítico y su efecto adverso en las células.	14
2.4.1 <i>Síntesis de ceramidas a partir del AP</i>	15
2.4.2 <i>Estrés oxidativo causado por el AP</i>	17
2.4.3 <i>Disfunción mitocondrial causada por AP</i>	17
2.5. Insulina: vía de señalización	19
2.6 Resistencia a la insulina y el papel del AP en su desarrollo	22
2.6.1 <i>Incremento en la producción de ceramidas.</i>	22
2.6.2 <i>Aumento en la producción de EROs</i>	23
2.6.3 <i>Señalización mTOR/S6K dependiente del ATP</i>	24
2.6.4 <i>Activación de PKCs por la señalización AP/GPR40</i>	25
2.7. Insulina y su papel en el cerebro	28
2.8 La resistencia a la insulina en neuronas promueve el deterioro cognitivo.	30
2.8.1 <i>Acumulación de β-amiloide y tau hiperfosforilada asociada con la resistencia a la insulina neuronal</i>	31
2.8.2 <i>Resistencia a la insulina neuronal por el consumo de dietas altas en grasa.</i>	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO GENERAL	36
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36

7. MATERIALES Y MÉTODOS	37
7.1 Cultivo celular	37
7.2 Cultivo primario	38
7.3 Tinción de la proteína asociada a microtúbulos-2	38
7.4 Preparación del ácido palmítico	39
7.5 Análisis de actividad oxido-reductora mitocondrial mediante ensayo de reducción de MTT	39
7.6 Cuantificación de la relación NAD ⁺ /NADH	40
7.7 Western blot	41
7.8 RT-PCR	42
7.9 Medición de Ca ²⁺	43
7.10 Cuantificación de ATP	44
7.11 Análisis estadístico	45
8. RESULTADOS	46
8.1 Cambios metabólicos en la neurona por la exposición al AP.	46
8.2 El AP inhibe la vía de señalización insulina/PI3K/Akt	49
8.3 El efecto inhibitorio del AP sobre la vía de la insulina requiere de la activación de mTOR	52
8.4 El AP incrementa la producción de EROs en la mitocondria e impide la señalización de la insulina	54
8.5 El AP reduce la señalización de la insulina a través de la activación de mTOR y PKCs	56
8.6 El AP induce movilización de Ca ²⁺ en neuronas	59
8.7 El AP promueve la entrada de Ca ²⁺ por un mecanismo independiente a la señalización de GPR40	61
8.8 El ATP generado de la β-oxidación del AP regula la entrada de Ca ²⁺	63
8.9 El incremento citosólico de Ca ²⁺ inducido por AP se asocia con resistencia a la insulina.	66
9. DISCUSIÓN	68
10. CONCLUSIONES	79
11. REFERENCIAS	80
ANEXOS: Artículos publicados	121
1. Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production	121
3. Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal	145

RESUMEN

El consumo de dietas altas en grasa (HFDs, por sus siglas en inglés) contribuye al desarrollo de alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina, obesidad y diabetes tipo II. En el sistema nervioso central (SNC) las HFD generan cambios estructurales y funcionales asociados a la reducción de la señalización de la insulina. El ácido palmítico (AP) es el ácido graso saturado más abundante en las HFDs y se ha encontrado que juega un papel muy importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en el hipotálamo, hígado, páncreas y músculo esquelético. La insulina regula varios aspectos de la función neuronal tales como diferenciación neuronal, sobrevivencia y plasticidad. Se ha relacionado al AP en el desarrollo de resistencia a la insulina neuronal, sin embargo no se conocen los mecanismos implicados. Por lo tanto, en el presente trabajo evaluamos el papel del AP en el desarrollo de resistencia a la insulina en neuronas diferenciadas de la línea celular del neuroblastoma humano MSN. Nuestros resultados muestran que el AP inhibe la señalización de la insulina mediante un mecanismo que implica la β -oxidación. Este efecto del AP implicó la participación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la producción de ATP. El ATP desencadenó por un lado la activación de la señalización de mTOR/S6K y la movilización de Ca^{2+} que activaron a la $\text{PKC}\alpha$, que modula negativamente la vía de la insulina.

ABSTRACT

The intake of high-fat diets (HFDs) leads to the development of metabolic disorders such as insulin resistance, obesity, and type II diabetes. In the central nervous system (CNS), HFDs induce structural and functional changes associated with the reduction of insulin signaling. Palmitic acid (PA) is the most abundant saturated fatty acid of HFDs and has been found to play a very important role in the development of insulin resistance in the hypothalamus, liver, pancreas, and skeletal muscle. Insulin regulates various aspects of neuronal function such as neuronal differentiation, survival, and plasticity. PA has been related to the development of neuronal insulin resistance; however, the mechanisms involved are not well understood. Therefore, in the present work we have evaluated the role of PA in the development of insulin resistance in neurons differentiated from human MSN neuroblastoma. Our results showed that PA inhibits insulin signaling through a mechanism involving the β -oxidation. We have also analyzed the participation of reactive oxygen species (ROS) and the production of ATP. We found that ATP produced the activation of mTOR / S6K signaling and the mobilization of Ca^{2+} that in turn, activated $\text{PKC}\alpha$, which negatively modulates the insulin pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización de la insulina y su efecto en células de tejido periférico.	21
Figura 2. Resistencia a la insulina por el AP en células de tejido periférico.....	27
Figura 3. Papel de la insulina en el cerebro.....	30
Figura 4. Representación gráfica del planteamiento del problema.	35
Figura 5. Efecto de la exposición al AP en la activación metabólica de la neurona.	48
Figura 6. La exposición al AP inhibe la señalización de la insulina.	50
Figura 7. La exposición al AP inhibe la señalización de la insulina en neuronas corticales.	51
Figura 8. Efecto de la insulina y AP en la activación de mTOR.....	53
Figura 9. El efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina es mediada por EROs mitocondrial.	55
Figura 10. La resistencia a la insulina en la neurona causada por el AP es bloqueada por la inhibición de mTOR y PKC.	58
Figura 11. El AP incrementó el Ca^{2+} intracelular en las células neuronales.	60
Figura 12. El AP incrementó los niveles de Ca^{2+} intracelular de manera independiente a la activación de GPR40.	62
Figura 13. Papel de la β -oxidación en la producción de ATP dependiente del AP y la movilización de Ca^{2+}	65
Figura 14. Efecto del Ca^{2+} en la reducción de la señalización de la insulina dependiente del AP y activación de PKC.	67
Figura 15. Mecanismos propuestos de resistencia a la insulina inducida por el AP.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN, ácido desoxirribonucleico

AMPK, cinasa dependiente de AMP

AP, ácido palmítico

APP, proteína precursora de amiloide

ARN, ácido ribonucleico

ATP, adenosine trifosfato

BHE, barrera hematoencefálica

BIM, bisindolilmaleimida 1

BSA, albúmina de suero bovino

DHA, ácido docosahexanoico

EA, enfermedad de Alzheimer

ECL, quimioluminiscencia aumentada

EROs, especies reactivas de oxígeno

FATPs, proteínas transportadoras de ácidos grasos

GPR40, receptor 40 acoplado a proteína G

GSK3, glucógeno sintasa cinasa 3

HFD, dietas altas en grasa

IRS-1, sustrato del receptor a la insulina 1

LTP, potenciación a largo plazo

mTORC1, complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamíferos

MTT, bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio

NAD+, nicotinamida adenina dinucleotido

NADH, nicotinamida adenina dinucleotido reducida

nsi, no significativo con respecto a la insulina

PBS, solución salina amortiguada por fosfatos

PFK2, fosfofructocinasa 2

PI3K, fosfatidilinositol- 3- cinasa

PKC, proteína cinasa C

PP2A, fosfatasa 2 A

RI, receptor de la insulina

RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa

SFB, suero fetal bovino

SEM, error estándar de la media

SNC, sistema nervioso central

VGCCs, canales de calcio sensibles a voltaje (voltage-gated calcium channels)

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de enfermedades metabólicas debido al consumo de dietas altas en grasa (HFDs, por sus siglas en inglés), se ha convertido en uno de los principales problemas de la medicina a nivel mundial, siendo México uno de los más afectados ya que ocupa el segundo lugar en obesidad (Barquera & Rivera, 2020). El interés por este tipo de alteraciones se ha acrecentado ya que estudios epidemiológicos muestran una importante correlación entre las enfermedades metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, diabetes y/o síndrome metabólico y el incremento en el riesgo de desarrollar algún déficit cognitivo, como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Arnold et al., 2014; Busquets et al., 2017; Chudoba, Wardelmann, & Kleinridders, 2019; Grant, 1999; McLean et al., 2019; Snowden et al., 2017)

El consumo de HFDs no sólo se ha relacionado con padecimientos metabólicos a nivel periférico, sino que varios estudios han mostrado que este tipo de dietas produce resistencia a la insulina en neuronas lo que se asocia con una reducción de la potenciación a largo plazo (LTP) y de la plasticidad sináptica, aunque la mayoría de los estudios se han centrado en las regiones del hipotálamo e hipocampo (Arnold et al., 2014; Calvo-Ochoa, Hernández-Ortega, Ferrera, Morimoto, & Arias, 2014; Clegg et al., 2011; Z. Liu, Patil, Sancheti, Yin, & Cadenas, 2017; Spinelli et al., 2017). Se sabe que el ácido palmítico (AP) es el ácido graso saturado más abundante de las HFD y que tiene una importante participación en el desarrollo de resistencia a la insulina en células de tejidos periféricos (Gao et al., 2010; Lam et al., 2002; Pereira & Alvarez-Leite, 2014; Posey et al., 2009; Ruddock et al., 2008; Yu et al., 2002) y en las neuronas (Benoit et al., 2009; Bumsup Kwon, Lee, & Querfurth,

2014; Mayer & Belsham, 2010); sin embargo, aún no se conocen todos los mecanismos moleculares implicados en estos efectos deletéreos del AP.

A diferencia de lo que ocurre en células de tejido periférico, el papel principal de la insulina cerebral no es regular la recaptura de glucosa por la célula, sino controlar la homeostasis energética (Benomar et al., 2006; Pearson-Leary, Jahagirdar, Sage, & McNay, 2018) y activar las vías de señalización implicadas en el crecimiento, supervivencia y plasticidad neuronales (Cheng et al., 2003; Chiu & Cline, 2010; X. Sun et al., 2010). Por lo tanto, una reducción de esta vía de señalización, puede afectar de manera significativa el funcionamiento del cerebro. Dado que el AP, el principal componente de las HFDs, se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina en diversos tejidos, este trabajo se enfocó en estudiar algunos de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina en neuronas expuestas a dosis elevadas, pero no neurotóxicas del AP.

2. ANTECEDENTES

2.1 Consumo de dietas altas en grasa y su efecto en el Sistema Nervioso Central.

La incidencia de alteraciones metabólicas se ha incrementado en las últimas décadas debido al tipo de dietas que se consumen y al sedentarismo que predomina, especialmente en el estilo de vida occidental. En la actualidad el 10% de la población mundial es obesa y se cree que para el 2030 habrá aproximadamente 1.12 billones de personas con obesidad (Kelly, Yang, Chen, Reynolds, & He, 2008). Estas enfermedades metabólicas son consecuencia del consumo de HFD cuya composición está caracterizada principalmente por colesterol y ácidos grasos saturados de origen animal, incluyendo el ácido mirístico (C14:0), esteárico (C18:0), laúrico (C12:0) y el más abundante, el palmítico (C16:0) (Austin, Ogden, & Hill, 2011; Chen, Huang, Zheng, Ni, & Bernards, 2018; Lu Wang et al., 2003).

Se sabe que el incremento de ácidos grasos libres en el plasma conduce al desarrollo de enfermedades crónicas como obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Blázquez & Quijada, 1968; Boden, 1999; Lavau, Fried, Susini, & Freychet, 1979; Sheehy & Sharma, 2010; Stern, Johnson, Batchelor, Zucker, & Hirsch, 1975; Vessby, 2003). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que este tipo de dietas también tienen un efecto nocivo en el sistema nervioso central (SNC), causando cambios estructurales y moleculares que incrementan el riesgo de desarrollar deterioro cognitivo y patologías asociadas al envejecimiento cerebral o a la EA (Arnold et al., 2014; Busquets et

al., 2017; Calvo-Ochoa et al., 2014; Chudoba et al., 2019; Grant, 1999; McLean et al., 2019; Snowden et al., 2017).

Varios estudios han mostrado que la exposición a HFD genera cambios morfológicos neuronales tales como reducción del árbol dendrítico o tamaño del soma, y alteraciones funcionales como una disminución en la potenciación a largo plazo y en la plasticidad sináptica (Calvo-Ochoa et al., 2014; Clegg et al., 2011; Z. Liu et al., 2017). Además, el consumo de este tipo de dietas se ha asociado con un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs), disfunción mitocondrial y procesos neuroinflamatorios (Tracey, Steyn, Wolvetang, & Ngo, 2018). Por otro lado, se sabe que las HFD afectan la homeostasis energética al alterar los niveles de neuromoduladores implicados en la señalización hipotalámica, como son el neuropéptido Y, las orexinas y la proopiomelanocortina (POMC) (Dziedzic, Szemraj, Bartkowiak, & Walczewska, 2007; Lemus et al., 2015). También se sabe que la exposición a HFD produce un incremento en los niveles de la proteína precursora del amiloide (APP) y del péptido β -amiloide (Julien et al., 2010; Maesako et al., 2015; Mazzei et al., 2021), así como hiperfosforilación de tau (Calvo-Ochoa et al., 2014; Montasir et al., 2020; Takalo et al., 2014), todos ellos considerados como marcadores de la EA (Arai, 1996; Davies, 1983; Gottfries, 1985; Growdon, 1999; Neugroschl & Davis, 2002).

2.2 Recaptura de ácidos grasos en el cerebro.

Los ácidos grasos se componen de una cadena de hidrocarbano con un grupo metilo y un grupo carboxilo terminal. Se clasifican en saturados, monosaturados y poliinsaturados de acuerdo al número de dobles enlaces que presenten: ninguno, uno, dos o más dobles enlaces

respectivamente. Además, también se clasifican de acuerdo al número de carbonos presentes en la longitud de su cadena: cadena corta (2-4 carbonos), cadena media (6-12 carbonos) y cadena larga (14-18 carbonos) (Bond, Miyazaki, O'Neill, Ding, & Ntambi, 2016; Nelson & Cox, 2005; Tvrzicka, Kremmyda, Stankova, & Zak, 2011). Se sabe que los ácidos grasos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y entrar a las neuronas; sin embargo, hay dos puntos de vista en cuanto a su principal mecanismo de entrada. Por un lado, se cree que por su composición química pueden cruzar la BHE por difusión simple y por otro lado, se propone que requieren de un sistema de transporte mediado por proteínas específicas para poder ingresar al cerebro. Estos transportadores son llamados proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs, por sus siglas en inglés) (John Edmond, 2001; Spector, 1988).

Las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs) son una familia de proteínas transmembranales compuesta de seis isoformas, las cuales tienen un sitio de unión al ácido graso, un dominio de unión a ATP y se ha visto que todas presentan actividad acil CoA sintasa. Aunque su mecanismo catalítico aún no es muy claro, se sabe que son proteínas bifuncionales (transportadoras y enzimas) y que su sobreexpresión incrementa la recaptura de ácidos grasos. Las FATPs están distribuidas en diferentes tejidos localizadas en membrana celular, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas (Gimeno, 2007; Glatz, Luiken, & Bonen, 2010). En particular, las FATP-1 y -4 que se localizan en las células endoteliales de la BHE son las responsables del transporte de los ácidos grasos hacia el cerebro. Este transporte es dependiente tanto de la longitud de la cadena como de la saturación del ácido graso (Mitchell & Hatch, 2011; Mitchell, On, Del Bigio, Miller, & Hatch, 2011; Ochiai et al., 2017). Una vez dentro del cerebro, los ácidos grasos de cadena

corta y media entran a la neurona mediante el mecanismo tipo flip-flop, sin embargo los ácidos grasos de cadena larga, requieren nuevamente de las FATPs para poder ingresar a la célula (Hamilton, 1999; Kamp & Hamilton, 2006; E. J. Murphy, Owada, Kitanaka, Kondo, & Glatz, 2005).

2.3 ¿Las neuronas pueden metabolizar ácidos grasos?

El 20% de la energía que utiliza el cerebro adulto proviene de la oxidación de ácidos grasos (Ebert, Haller, & Walton, 2003). Sin embargo, ¿qué células llevan a cabo la β -oxidación? Esta es una pregunta que recientemente ha generado controversia. Por mucho tiempo se creyó que sólo los astrocitos eran los encargados de metabolizar ácidos grasos mediante la β -oxidación esto medido a través de producción de $^{14}\text{CO}_2$ (Amruthesh, Boerschel, McKinney, Willoughby, & Ellis, 1993; Auestad, Korsak, Morrow, & Edmond, 1991; J. Edmond, Robbins, Bergstrom, Cole, & de Vellis, 1987; M. G. Murphy, Jollimore, Crocker, & Her, 1992; Robert, Montaudon, & Hugues, 1983; Yim, Monsma, Hertz, & Szuchet, 1986). Ahora, también se sabe que las neuronas cuentan con toda la maquinaria para llevar a cabo el proceso de β -oxidación, como la carnitina palmitoiltransferasa (CPT) y la proteína desacopladora mitocondrial (UCP2) (Nalecz, Miecz, Berezowski, & Cecchelli, 2004; Sierra et al., 2008). En un estudio previo y con la finalidad de observar si las neuronas respondían de igual manera a los ácidos grasos y a la glucosa, algunos autores evaluaron la movilización de Ca^{2+} mediante el uso Fura 2-AM en la presencia de ácido oleico o glucosa, lo que encontraron fue que las neuronas responden a los ácidos grasos de una manera independiente de la glucosa, lo cual podría indicar que éstos producen cambios

metabólicos independientes de la glucosa (Le Foll, Irani, Magnan, Dunn-Meynell, & Levin, 2009).

Actualmente, se propone que las neuronas podrían llevar a cabo la β -oxidación, pero en niveles limitados en comparación con los astrocitos. Esto debido a que ya se ha demostrado que la actividad de proteínas mitocondriales que participan en la β -oxidación es muy baja en las neuronas en comparación con la de las células periféricas o con los astrocitos. Por ejemplo, la 3-cetoacil-coenzima A tiene solamente el 0.7% de actividad comparada con las otras células, la acil-CoA deshidrogenasa el 50% y la enoil-CoA-deshidrogenasa el 19%. Así mismo, se sabe que la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial es mayor en los astrocitos en comparación con las neuronas (Peter Schönfeld & Reiser, 2013; Speijer, 2011; S. Y. Yang, He, & Schulz, 1987). Por esta razón, se cree que los astrocitos son las principales células del SNC que llevan a cabo la β -oxidación de ácidos grasos, sin embargo cada vez hay más evidencia que sugiere que las neuronas bajo condiciones metabólicas especiales, también podrían realizar dicho proceso metabólico.

2.4 El ácido palmítico y su efecto adverso en las células.

El ácido palmítico (AP) es un ácido graso saturado de cadena larga con 16 carbonos. Se puede obtener de la dieta, o bien, sintetizar a partir de aminoácidos, carbohidratos y otros ácidos grasos. Muchos estudios se han enfocado en este ácido graso, ya que se sabe que es el más abundante en el cuerpo humano (65% de los ácidos grasos saturados) y el principal componente de las HFD (Carta et al., 2015; Innis, 2016; Mancini et al., 2015). Además, se ha observado que en personas con obesidad los niveles de AP se encuentran elevados en el

plasma asociado con el desarrollo de enfermedades como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y, recientemente, se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas (Carta, Murru, Banni, & Manca, 2017; Clore, Allred, White, Li, & Stillman, 2002; Mancini et al., 2015; Trombetta et al., 2013).

En células de tejido periférico ya se conocen diferentes rutas metabólicas por las cuales el AP en altas concentraciones ejerce su efecto nocivo, sin embargo, los mecanismos implicados en su metabolismo neuronal y las consecuencias deletéreas de este metabolismo, aún no han sido bien estudiados. Dentro de los efectos descritos a nivel de periferia se encuentra el incremento de los niveles de ceramidas mediante su síntesis de novo, la activación de PKCs y el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs), que en conjunto resultan en distintas patologías como estrés oxidativo, daño mitocondrial o resistencia a la insulina.

2.4.1 Síntesis de ceramidas a partir del AP

Las ceramidas pertenecen a la familia de los esfingolípidos y se componen de un ácido graso unido a una esfingosina mediante un enlace amida. Una de sus principales funciones es proporcionar integridad estructural a la célula al ser un componente de la membrana celular y actuar como segundo mensajero en diferentes vías de señalización (Gomez-Larrauri, Das Adhikari, Aramburu-Nuñez, Custodia, & Ouro, 2021; Kolesnick, 1992; Meckfessel & Brandt, 2014; Uchida & Park, 2021). Recientemente, se ha visto que la modulación del contenido de ceramidas se asocia con diferentes patologías como diabetes,

resistencia a la insulina, cáncer, EA, enfermedad arterial coronaria y depresión (Kurz, Parnham, Geisslinger, & Schiffmann, 2019), por lo que resulta importante estudiar los mecanismos y condiciones implicados en el incremento de su síntesis.

Las ceramidas son sintetizadas por tres vías: a) La hidrólisis de la esfingomielina mediante la acción de la esfingomielinasa, que rompe la esfingomielina en ceramida y fosfocolina. Esta vía es activada en respuesta al estrés. b) La vía de reciclaje, en la cual la esfingosina es degradada a ceramidas por la ceramida sintasa. En ambas vías tanto la esfingomielina como la esfingosina requieren de una previa ceramida sintetizada a partir de la vía de novo. c) En la vía de novo la ceramida es sintetizada a partir de la condensación de serina con palmitoil-CoA por la acción de la serina palmitoil transferasa (Gault, Obeid, & Hannun, 2010; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019; Summers, Chaurasia, & Holland, 2019).

Por lo tanto, a pesar de existir tres vías de síntesis para las ceramidas, el AP es esencial para su formación, lo que conlleva a que un incremento de este ácido graso se asocie al aumento de los niveles de ceramidas y con ello se ejerza un efecto negativo para la célula. En el SNC, se ha observado que el metabolismo de ácidos grasos saturados en los astrocitos aumenta la síntesis de ceramidas, lo cual favorece la producción de la proteína β -amiloide y la hiperfosforilación de tau como consecuencia de la exposición a dosis altas del AP (mayor de 200 μ M) (L. Liu, Martin, & Chan, 2013; Patil, Melrose, & Chan, 2007). Por otro lado, al igual que en células de tejido periférico, se ha visto que el incremento de ceramidas derivado de un consumo exacerbado de HFD, disminuye la señalización de la insulina, produce disfunción mitocondrial y propicia un estado pro-inflamatorio (Campana et al., 2018; Bumsup Kwon et al., 2014), aunque los mecanismos implicados aún no han sido bien descritos.

2.4.2 Estrés oxidativo causado por el AP

En células de tejido periférico el AP en concentraciones patológicas (superior o igual a 200 μM) conduce a un incremento en las EROs y estrés oxidante, que produce alteraciones en el potencial de membrana y disfunción mitocondrial (Alnahdi, John, & Raza, 2019; Hua et al., 2015; L. Yang et al., 2019). Además de su metabolismo oxidativo, otro de los mecanismos descritos a través del cual el AP produce estrés oxidante es a través de incrementar la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) y a la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} en la mitocondria que produce disfunción de la superóxido dismutasa e incremento en los niveles de EROs (Ly et al., 2017). A pesar de que las EROs tienen un papel fisiológico como segundos mensajeros, cuando éstos se encuentran elevados se asocia principalmente con estrés oxidativo y apoptosis (J. Liu et al., 2015). Por otro lado, el estrés oxidante puede producir oxidación de proteínas y causar estrés de retículo endoplásmico, pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} y disfunción mitocondrial, generando un círculo vicioso de daño (Ly et al., 2017). Como ya se mencionó, estos mecanismos han sido estudiados en células de tejido periférico. Sin embargo, aún no han sido estudiados a profundidad los mecanismos por los cuales el AP pueda incrementar EROs o generar estrés oxidativo en la neurona.

2.4.3 Disfunción mitocondrial causada por AP

Uno de los efectos negativos de mayor impacto inducido por AP es la disfunción mitocondrial. Aparte de la inflamación y el estrés oxidativo con los que ha sido asociado, se ha visto que la exposición de las células de tejido periférico a este ácido graso altera el

potencial de membrana mitocondrial, así como la fragmentación de dicho organelo. Por otra parte, cuando la célula es expuesta a una dosis alta de AP durante un periodo largo (24 horas), el aumento en la producción de EROs debido a su β -oxidación produce disfunción mitocondrial y, como consecuencia, bajos niveles en la producción de ATP (Amorim et al., 2021; Cho, Basu, Dai, Heldak, & Makino, 2013; García-Ruiz, Solís-Muñoz, Fernández-Moreira, Muñoz-Yagüe, & Solís-Herruzo, 2015; Itami, Shirasuna, Kuwayama, & Iwata, 2018; Nisr & Affourtit, 2016; Sergi, Luscombe-Marsh, Naumovski, Abeywardena, & O'Callaghan, 2021; L Yuzefovych, Wilson, & Rachek, 2010; LV Yuzefovych, Solodushko, Wilson, & Rachek, 2012).

Con relación al cerebro, los mecanismos que producen disfunción mitocondrial dependiente del AP han sido poco estudiados. Sin embargo, se ha reportado en células de neuroblastoma Neuro-2a que la exposición al AP durante 24 horas aumenta la producción de superóxido dismutasa y disminuye los niveles de ATP indicando esto último un posible daño mitocondrial. Ambos resultados correlacionaron con desensibilización a la insulina. Aunque en ese trabajo no fue evaluado, se ha visto por otros grupos de investigación que el incremento de superóxido dismutasa elimina H_2O_2 , la cual como ya se mencionó, facilita la señalización de la insulina, por lo tanto su eliminación contribuye a la desensibilización de los efectos de esta hormona (Bumsup Kwon et al., 2014). Por otro lado, la exposición de células hipotalámicas al AP disminuye los niveles de proteína mitofusina-2 implicada en la fusión y capacidad oxidativa de la mitocondria (Diaz et al., 2015). Además, células de cultivos neuronales del ganglio de la raíz dorsal expuestas al AP por 24 horas, también mostraron una reducción en el potencial de membrana mitocondrial y en la producción de ATP, dichos cambios fueron acompañados de alteraciones en la morfología y tráfico

mitocondrial (Rumora et al., 2018; Rumora, LoGrasso, Haidar, et al., 2019; Rumora, LoGrasso, Hayes, et al., 2019). Interesantemente, la disfunción mitocondrial causada por el AP se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina, tanto en células de tejido periférico como en el SNC (Hirabara, Curi, & Maechler, 2010; C. Yang et al., 2012)

En este trabajo nos enfocamos en el estudio de algunos mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por AP.

2.5. Insulina: vía de señalización

La insulina es una hormona que juega un papel importante en la regulación del metabolismo humano, es secretada por las células β -pancreáticas en los islotes de Langerhans. Una de las funciones principales de la hormona es regular los niveles de glucosa en la sangre propiciando su internalización en la célula (Rahman et al., 2021). Sin embargo, también coordina otros procesos que resultan esenciales como son: autofagia, síntesis de proteínas, lipogénesis, transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, apoptosis y gluconeogénesis, por lo tanto la disminución de la señalización de la hormona, resulta en la alteración de dichos procesos (Michael P Czech, 2020; Guo, 2014; Tokarz, MacDonald, & Klip, 2018).

La señalización de la hormona comienza con la activación del receptor tirosina cinasa de la insulina (RI), el cual tras ser activado mediante su autofosforilación en residuos de tirosina recluta y fosforila principalmente al sustrato del receptor a la insulina (IRS) y Shc. Estas proteínas desencadenan diferentes cascadas de señalización intracelular, río abajo de Shc se activa la vía de las MAPKs, mientras que la fosforilación de IRS conduce a la activación de

la señalización PI3K/Akt, siendo esta última la vía en la que nos centraremos en este trabajo por ser la responsable de regular diversos eventos metabólicos que incluyen el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos, crecimiento celular, sobrevivencia y en el cerebro, eventos de plasticidad (M P Czech, Klarlund, Yagaloff, Bradford, & Lewis, 1988; De Meyts, 2000; Wilcox, 2005).

En la vía insulina/PI3K el RI activado interacciona con el IRS y lo fosforila. Esta fosforilación permite su unión al dominio SH2 de la subunidad reguladora de PI3K, generando un cambio conformacional que genera la activación de su subunidad catalítica. Como resultado, p110 que es la subunidad catalítica se transloca a la membrana fosforilando al fosfatidilinositol 4-fosfato para producir PIP2 y PIP3. PIP3 recluta a Akt a la membrana plasmática donde es fosforilada en los residuos de Ser473 y Thr308. Algunas de las proteínas que son fosforiladas por Akt son la, la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la fosfofructocinasa 2 (PFK2), la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD). Por otro lado, la proteína Shc, se asocia con la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógeno, MAPK, que regula proliferación y crecimiento en las células (Goalstone & Draznin, 1997; Kadowaki et al., 1996; Pessin & Saltiel, 2000; Sasaoka & Kobayashi, 2000; Vázquez-Jiménez, Roura-Guiberna, Jiménez-Mena, & Olivares-Reyes, 2017; M. F. White, 1997; Morris F. White, 1994) (**Figura 1**).

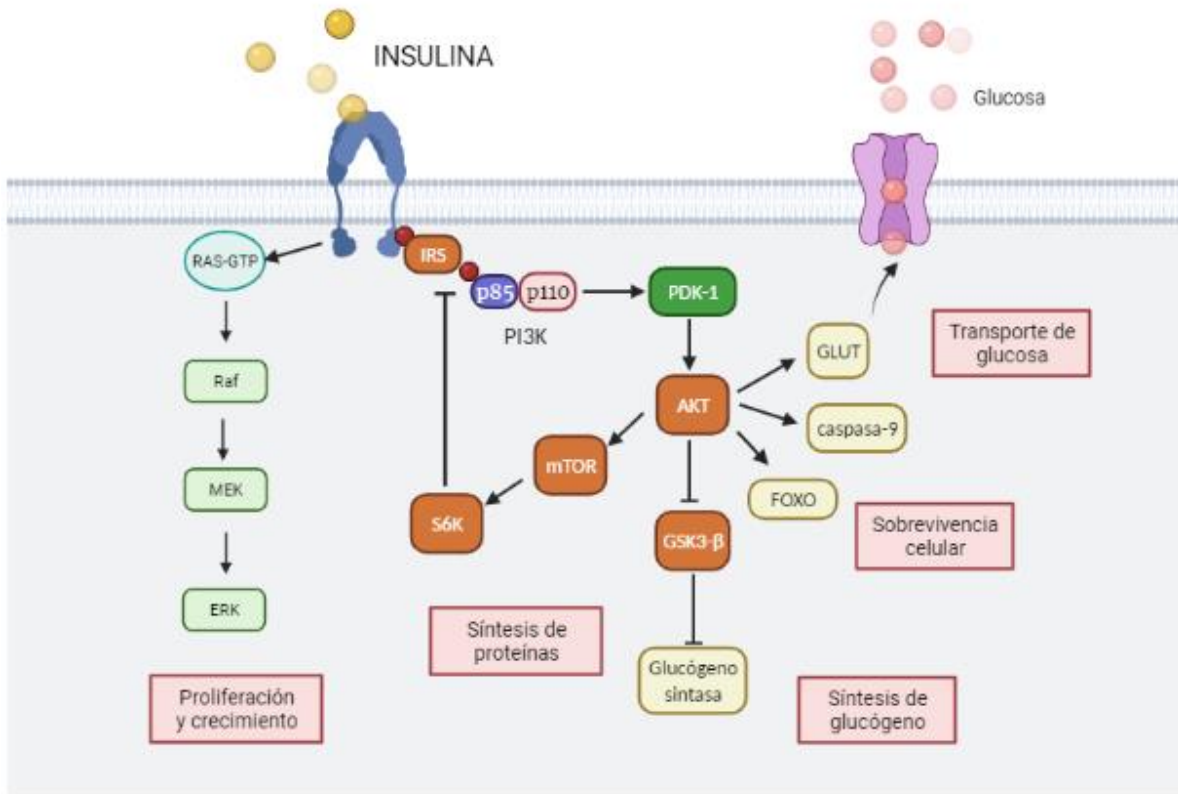


Figura 1. Vía de señalización de la insulina y su efecto en células de tejido periférico.

Se muestra la activación de la señalización de la insulina por su unión al receptor, la autofosforilación de IR promueve la unión de p85 y activación de p110 que resulta en la activación de Akt. Akt regula procesos mediante sus efectores, entre éstos síntesis de proteínas, síntesis de glucógeno, supervivencia celular y transporte de glucosa. También se muestra la vía de las MAPKs desencadenada a partir de la activación del RI y que regula proliferación y crecimiento (Imagen realizada con la versión libre de BioRender).

2.6 Resistencia a la insulina y el papel del AP en su desarrollo

La resistencia a la insulina se define como una respuesta disminuida de la célula ante niveles normales o elevados de la hormona (Wilcox, 2005). Existen varios estudios que muestran que el consumo de HFD induce un estado de resistencia a la insulina (Gilani et al., 2018; Pataky et al., 2017; Small, Brandon, Turner, & Cooney, 2018; Y.-J. Zhang et al., 2019) y específicamente el AP es considerado como el principal responsable de dicho efecto (Denhez et al., 2020; López-Gómez et al., 2020; Saraswathi et al., 2020; Y. Sun et al., 2021; Liqiang Wang et al., 2020; Won, Choi, Kang, & Kim, 2021; Zywno et al., 2021). A continuación se mencionan algunos mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a la insulina por el AP en células de tejido periférico.

2.6.1 Incremento en la producción de ceramidas.

Se sabe que la proteína Akt es el principal blanco de las ceramidas para promover resistencia a la insulina mediante dos mecanismos: la activación de fosfatasa y de PKCs atípicas. Con respecto a la activación de fosfatasa por ceramidas, se ha descrito que ésta última se une al inhibidor endógeno 2 de la fosfatasa 2 A (PP2A, por sus siglas en inglés), generando la disociación del complejo y por ende la activación y translocación a la membrana plasmática de PP2A, donde desfosforila a Akt (Chavez & Summers, 2012; Holland & Summers, 2008; Mahfouz et al., 2014). Con relación a las PKCs, se ha demostrado tanto en células de músculo esquelético como de adipocitos, que las ceramidas se unen a PKCs atípicas activándolas de manera directa, específicamente a la

isoforma zeta (PKC ζ). Una vez activa la PKC ζ , fosforila el dominio PH de Akt en el residuo Thr34/Ser34 impidiendo su translocación a la membrana plasmática (Miura et al., 2003; Powell, Turban, Gray, Hajduch, & Hundal, 2004; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019). Mediante estos dos mecanismos se ha implicado a las ceramidas con el desarrollo de resistencia a la insulina.

2.6.2 Aumento en la producción de EROs

Se sabe que la señalización de la insulina requiere la producción de un pulso transitorio de H₂O₂ que promueve la activación del receptor de la insulina mediante la modulación de PP2A por su unión a esta última proteína (Mahadev, Zilbering, Zhu, & Goldstein, 2001; Persiyantseva et al., 2013; Pomytkin & Kolesova, 2003). Sin embargo, también se conoce que el metabolismo de los ácidos grasos puede producir niveles altos de EROs de manera sostenida (Anderson et al., 2009; Bonnard et al., 2008; Koves et al., 2008), lo que activa catalasas que descomponen el H₂O₂ (Besse-Patin & Estall, 2014), afectando de esta manera, la señalización de la insulina. Además, es importante mencionar que el incremento en las EROs también promueve estrés oxidativo y daño mitocondrial que puede conducir a hipoxia celular y apoptosis (Anderson et al., 2009; Goldstein, Mahadev, Kalyankar, & Wu, 2005; Hoehn et al., 2009; P Schönfeld & Wojtczak, 2008; Peter Schönfeld & Reiser, 2013).

2.6.3 Señalización mTOR/S6K dependiente del ATP

mTOR es una cinasa serina/treonina considerado como un sensor de nutrientes y regulador metabólico dado que su activación depende de la presencia de ATP (Dennis et al., 2001; Saxton & Sabatini, 2017). La actividad de mTOR se lleva a cabo mediante dos complejos: mTORC1 (mTOR/raptor), cuya activación ha sido relacionada con la regulación negativa de la vía de la insulina; y mTORC2, que regula positivamente la vía de la hormona (Ardestani & Maedler, 2018; W. J. Oh & Jacinto, 2011). Varios estudios han mostrado que el complejo mTORC1 promueve desensibilización a la insulina mediante la activación de la cinasa S6K que fosforila a IRS en un residuo de serina que la inhibe, modulando negativamente la vía insulina/PI3K/Akt (Ardestani & Maedler, 2018; W. J. Oh & Jacinto, 2011; Shah, Wang, & Hunter, 2004; X. Wang et al., 2010; J. Zhang, Gao, Yin, Quon, & Ye, 2008). El complejo mTORC1 puede ser activado de tres maneras, por Akt directamente, por la inhibición de la cinasa dependiente de AMP y por PKCs. Se sabe que la cinasa dependiente de AMP (AMPK) fosforila a raptor impidiendo la formación del complejo mTORC1, sin embargo, en la presencia de ATP, se disminuye la actividad de AMPK lo que resulta en la formación del complejo mTORC1 (Dennis et al., 2001; Y. C. Kim & Guan, 2015; B Kwon & Querfurth, 2015; Saxton & Sabatini, 2017; Sengupta, Peterson, & Sabatini, 2010). Por otro lado, también se ha observado que mTOR es fosforilado en el residuo serina 2448 por PKC nuevas, favoreciendo la formación del complejo mTORC1 y la activación de S6K (Moschella, Rao, McDermott, & Kuppuswamy, 2007; Ribeiro et al., 2018). En células de tejido periférico, se ha sugerido que la β -oxidación del AP al igual que las PKCs activadas dependientes de este ácido graso,

desencadenan la activación de mTOR/S6K y su regulación negativa en la vía de la insulina (C. Kwon, Sun, Jeong, & Jung, 2020; Marafie, Al-Shawaf, Abubaker, & Arefanian, 2019; X. Wang et al., 2010).

2.6.4 Activación de PKCs por la señalización AP/GPR40

El GPR40 es un receptor de ácidos grasos libres (FFARs, por sus siglas en inglés), perteneciente a una familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que han sido implicados en la regulación metabólica. Hay cuatro FFARs: los GPR43 y GPR41 son activados por ácidos grasos de cadena corta, mientras que los GPR40 y GPR120 son activados por ácidos grasos de cadena media y larga (Briscoe et al., 2003; Hara, Hirasawa, Ichimura, Kimura, & Tsujimoto, 2011; Hara, Kimura, Inoue, Ichimura, & Hirasawa, 2013; Hirasawa, Hara, Katsuma, Adachi, & Tsujimoto, 2008; Ichimura, Hirasawa, Hara, & Tsujimoto, 2009).

El GPR40 ha sido de interés para diversos estudios, por un lado es el receptor de ácidos grasos más abundante en el SNC y por otro, se sabe que regula la secreción de insulina en células β -pancreáticas (Y Itoh & Hinuma, 2005; Yasuaki Itoh et al., 2003; Nolan, Madiraju, Delghingaro-Augusto, Peyot, & Prentki, 2006; Schnell, Schaefer, & Schöfl, 2007; Shapiro, Shachar, Sekler, Hershfinkel, & Walker, 2005). Adicional al metabolismo del AP, en células de tejido periférico se ha visto que algunas de las acciones de este ácido graso pueden ser mediadas a través de la activación del GPR40, que a su vez activa a la fosfolipasa C (PLC) produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El IP3

estimula sus receptores localizados en el retículo endoplásmico generando la liberación de Ca^{2+} que junto con el DAG activan PKCs. Estas últimas se han visto implicadas en la fosforilación de IRS-1 en residuos de inhibición, modulando negativamente la vía de la insulina (Y Itoh & Hinuma, 2005; Yasuaki Itoh et al., 2003; Schnell et al., 2007; Shapiro et al., 2005). Se sabe que el GPR40 en las neuronas es activado por el ácido docosahexanoico (DHA) (Zamarbide et al., 2014), sin embargo, hay muy pocos estudios que han evaluado la activación de este receptor por el AP en las neuronas y los resultados son contradictorios. Algunos autores afirman que el GPR40 es activado por el AP en la neurona, mientras otros afirman que a diferencia del DHA el AP no lo activa directamente (Hernández-Cáceres et al., 2019; J. Y. Kim et al., 2017).

Los mecanismos anteriormente descritos, se esquematizan en la **Figura 2**.

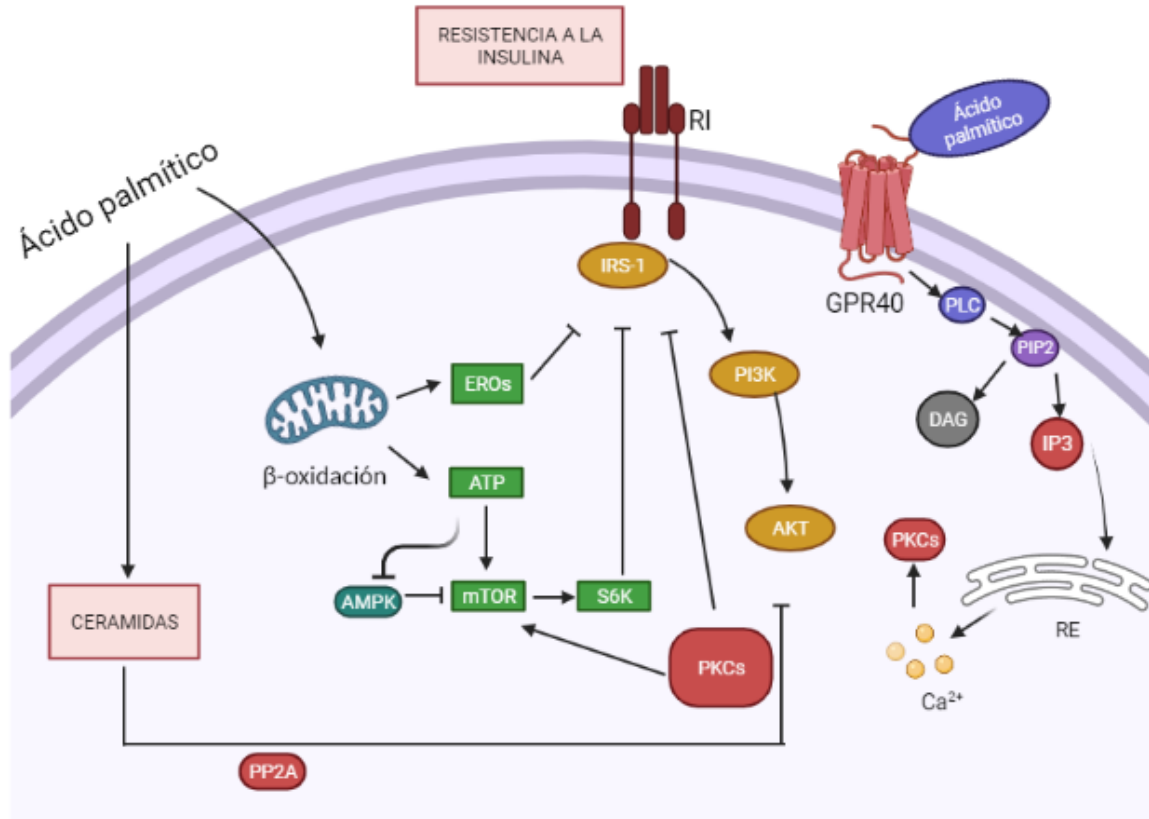


Figura 2. Resistencia a la insulina por el AP en células de tejido periférico.

El AP incrementa la producción de ceramidas que se unen al inhibidor endógeno de la PP2A dejando activa a la fosfatasa quien desfosforila a Akt, impidiendo la señalización de la insulina. Otro mecanismo es el resultante por su β -oxidación, se incrementan los niveles de EROs que regulan negativamente la vía; también hay una mayor producción de ATP que inhibe a AMPK resultando en la activación de la señalización de mTOR/S6K, fosforilando en residuos de inhibición al IRS. GPR40 es activado por el AP, se activa la fosfolipasa C que hidroliza a PIP2 generando DAG e IP3, éste último se une a su receptor en el retículo endoplásmico liberando Ca^{2+} que junto con el DAG activan PKCs clásicas y nuevas las cuales contribuyen a la activación de mTOR y/o inhibición de IRS-1. (Imagen realizada con la versión libre de BioRender)

2.7. Insulina y su papel en el cerebro

Durante muchas décadas se creyó que el cerebro era un órgano insensible a la insulina, sin embargo ahora se sabe que la hormona viaja por el torrente sanguíneo y cruza la barrera hematoencefálica (BHE) mediante un sistema de transporte saturable (Banks, Owen, & Erickson, 2012). Una vez en el cerebro, tiene un papel importante en el funcionamiento neuronal como un modulador metabólico, de crecimiento, de plasticidad sináptica y de supervivencia celular (Biessels & Reagan, 2015; Sánchez-Alegría, Flores-León, Avila-Muñoz, Rodríguez-Corona, & Arias, 2018; W. Zhao et al., 1999). Los receptores de la insulina (RIs) se expresan en el cerebro completo, sin embargo, desde una perspectiva temporal, la expresión más alta del receptor se da en etapas tempranas del desarrollo, por esta razón se ha propuesto que la señalización de la insulina es crítica para el proceso de maduración, neurogénesis y sinaptogénesis (Chiu & Cline, 2010; Kar, Chabot, & Quirion, 1993; Plum, Schubert, & Brüning, 2005).

La vía de la insulina/PI3K/Akt modula el metabolismo neuronal a través de la expresión del transportador de glucosa GLUT3 y de la enzima fosfofructocinasa-1 (PFK-1) incrementando de esta manera la actividad glucolítica de la neurona (Agostini et al., 2016). Además, aunque mayormente el transporte de glucosa es independiente de la señalización de la insulina (McEwen & Reagan, 2004), en condiciones donde las neuronas hipocámpales presentan alta demanda energética posterior a un incremento en su actividad eléctrica, se aumenta el transporte de glucosa mediante la translocación de GLUT4 a la membrana, vía señalización de insulina/PI3K. Por lo tanto, la disminución en la señalización de la insulina

puede producir un desbalance energético y pérdida de la homeostasis de glucosa también en las neuronas (Pearson-Leary et al., 2018).

Por otro lado, hay varios estudios que muestran que la señalización de la insulina en el hipocampo aumenta la neurotransmisión glutamatérgica mediada por los receptores a NMDA (Christie, Wenthold, & Monaghan, 1999; L. Liu, Brown, Webster, Morrisett, & Monaghan, 1995; Skeberdis, Lan, Zheng, Zukin, & Bennett, 2001), y promueve la potenciación a largo plazo (LTP) y la translocación del receptor de glutamato a la membrana (L. Liu et al., 1995; Skeberdis et al., 2001). En modelos animales, la administración intranasal de insulina mejora la ejecución de tareas cognitivas, promueve eventos de plasticidad sináptica y previene la apoptosis celular (Hallschmid, 2021; Roque et al., 2021). Dado que la insulina está involucrada en la modulación de vías implicadas en memoria y aprendizaje, alteraciones en su señalización se han asociado con la presencia de déficit cognitivo, como en la EA (**Figura 3**).

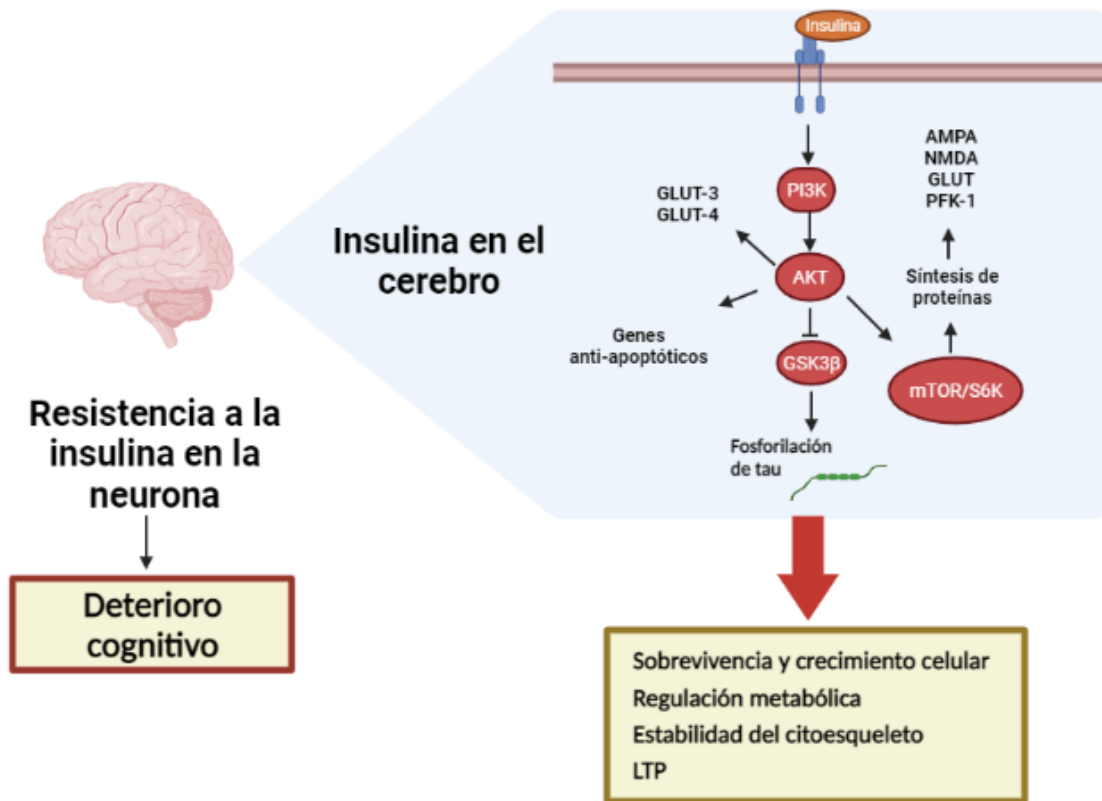


Figura 3. Papel de la insulina en el cerebro.

La vía de la insulina regula sobrevivencia y crecimiento mediante la modulación de proteínas anti-apoptóticas por Akt; procesos de plasticidad neuronal como LTP, por la síntesis de proteínas involucradas en la actividad sináptica, como son los receptores AMPA y NMDA; regulación metabólica por la síntesis de proteínas como PFK-1 y transportadores de glucosa; y mantiene la estabilidad del citoesqueleto al inhibir a GSK3 β que fosforila a tau. El impedimento en la señalización insulina/PI3K/Akt en las neuronas, resulta en deterioro cognitivo (Imagen realizada con la versión libre de BioRender).

2.8 La resistencia a la insulina en neuronas promueve el deterioro cognitivo.

Como se mencionó previamente, varios estudios epidemiológicos han mostrado una importante correlación entre la resistencia a la insulina periférica presente en personas con diabetes tipo 2 y el deterioro cognitivo. Sin embargo, estudios recientes también muestran

que estas alteraciones en el aprendizaje y la memoria son precedidas por el desarrollo de resistencia a la insulina en las neuronas (Kong, Park, Lee, Cho, & Moon, 2018; Spinelli et al., 2017; Willmann et al., 2020; H. Zhao et al., 2019). Hablar de resistencia a la insulina y deterioro cognitivo, lleva hacia dos posibilidades: 1) que la resistencia a la insulina sistémica preceda a la cerebral y finalmente contribuya al desarrollo de alteraciones cognitivas; o bien, 2) que el desarrollo de resistencia a la insulina neuronal promueva cambios que resulten en la desregulación metabólica hipotalámica y esto conlleve a resistencia a la insulina periférica (Weinstein et al., 2015; P L Yau et al., 2010; Po Lai Yau et al., 2012). La mayor parte de estudios han apoyado la primera hipótesis debido a los procesos pro-inflamatorios involucrados con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 y el daño observado en la BHE. Es un hecho que la resistencia a la insulina neuronal se asocia con cambios bioquímicos y estructurales en la neurona que repercuten en su funcionamiento.

2.8.1 Acumulación de β -amiloide y tau hiperfosforilada asociada con la resistencia a la insulina neuronal

La acumulación de la proteína β -amiloide y de tau en estado de hiperfosforilación son dos de los principales marcadores histopatológicos de la EA (Greenwald & Riek, 2010; Hardy & Selkoe, 2002; Pearson & Peers, 2006). Interesantemente varios estudios sugieren que la resistencia a la insulina promueve la aparición de ambos marcadores (de la Monte, 2012; Gabbouj et al., 2019). Por ejemplo, señalización insulina/PI3K/Akt, resulta en la fosforilación de GSK3 β en residuos de serina produciendo su inhibición, por lo tanto, un

estado de resistencia a la insulina permite la activación de esta cinasa. En consecuencia, la constante activación de la GSK3 β , una cinasa del tipo serina/treonina que fosforila de manera directa a tau, resulta en un estado de hiperfosforilación de la proteína tau asociando con alteraciones en el citoesqueleto de la célula (Calvo-Ochoa et al., 2014; Chatterjee, Ambegaokar, Jackson, & Mudher, 2019; Gonçalves, Wijesekara, Fraser, & Felice, 2019; Imamura et al., 2020; Morales-Corraliza et al., 2016).

Con relación a la acumulación de la proteína β -amiloide, varios estudios han mostrado que la señalización de la insulina favorece el tráfico de la APP hacia la membrana plasmática posterior a su síntesis y estimula la secreción del péptido β -amiloide hacia el espacio extracelular disminuyendo sus niveles intracelulares (Gasparini et al., 2001; Qiu et al., 1998; Watson et al., 2003).

La resistencia a la insulina en el cerebro no sólo se ha asociado con la presencia de estos marcadores histopatológicos, sino también con cambios morfológicos en la neurona como la disminución del árbol dendrítico, especialmente de neuronas hipocampales, así como la reducción en el número de neuronas maduras en el giro dentado (Calvo-Ochoa et al., 2014; W.-C. Liu et al., 2018; Reagan et al., 2021; M. Wang, Yoon, Song, & Jo, 2021), se ha visto que la resistencia a la insulina precede a procesos neuro-inflamatorios, estrés oxidativo, daño mitocondrial y disfunción sináptica (Lanzillotta et al., 2021; Lee, Tong, Hang, Deochand, & de la Monte, 2013; Sripetchwandee, Chattipakorn, & Chattipakorn, 2018; J. Wang et al., 2019; Wohua & Weiming, 2019).

2.8.2 Resistencia a la insulina neuronal por el consumo de dietas altas en grasa.

Como ya se mencionó, existe evidencia que muestra que el consumo de HFD conlleva a una disminución en la señalización de la insulina y que esto se correlaciona con cierto deterioro cognitivo (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010; Arnold et al., 2014; H. Oh, Boghossian, York, & Park-York, 2013; Spinelli et al., 2017; Yujie et al., 2020). Algunos trabajos han reportado que el AP también promueve resistencia a la insulina en la neurona y que esto se correlaciona con alteraciones bioquímicas y morfológicas en las neuronas (Amine, Benomar, & Taouis, 2021; Benoit et al., 2009; Campana et al., 2018; Mayer & Belsham, 2010; Spinelli et al., 2017). Hasta el momento el único mecanismo descrito ha sido en neuronas hipotalámicas donde se encontró que el AP es capaz de inducir la translocación de la PKC- θ a la membrana asociándose con una disminución en los niveles de fosforilación de Akt y un aumento en la fosforilación del IRS-1 pero en residuos de serina que son de inhibición. Por lo cual ellos concluyen que el AP produce desensibilización a la insulina al promover la fosforilación de IRS en residuos de inhibición por PKC $-\theta$ (Benoit et al., 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias que sugieren que alteraciones en la vía de señalización de la insulina en el cerebro repercuten en la sobrevivencia celular, síntesis de proteínas y estabilidad del citoesqueleto neuronal, contribuyendo en conjunto al deterioro cognitivo. Por otro lado, el consumo de HFDs es uno de los principales factores que alteran la señalización de esta hormona en el SNC. Sin embargo, no se conoce cuáles son los mecanismos implicados en la disminución de la señalización de la insulina a partir del consumo de este tipo de dietas. Conociendo que el AP es el ácido graso saturado más abundante en estas dietas y considerando que induce el desarrollo de la resistencia a la insulina en tejidos periféricos, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina en neuronas humanas (células MSN) expuestas a dosis altas de AP. Los mecanismos que se evaluaron para ver el efecto del AP sobre la vía de la insulina son: producción de EROs y ATP debido a la β -oxidación del AP, participación de la señalización mTOR/S6K y la activación de la señalización GPR40/PKC (Figura 4).

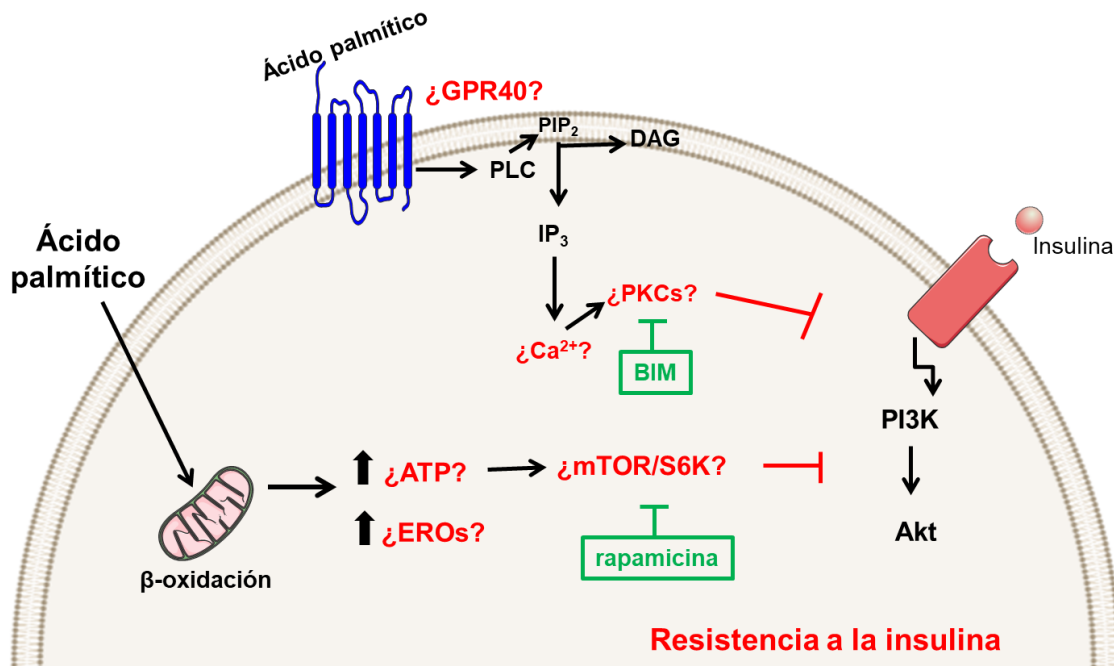


Figura 4. Representación gráfica del trabajo.

Se usó rapamicina, un inhibidor de mTOR, para evaluar la participación de mTOR/S6K que pudiera ser activada por el ATP generado a partir de la β-oxidación del AP. Se estudió la participación de EROs sobre el desarrollo de resistencia a la insulina por el AP. Para evaluar si el AP activó el GPR40, se midió las concentraciones de Ca²⁺ en presencia del AP, así como la activación de PKC mediante su inhibidor BIM.

4. HIPÓTESIS

La exposición neuronal al AP induce resistencia a la insulina a través de su metabolismo energético y/o activación del receptor GPR40.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los mecanismos de acción del AP que participan en el desarrollo de resistencia a insulina en neuronas.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar el efecto del AP sobre la actividad metabólica en neuronas humanas diferenciadas del neuroblastoma humano MSN.
2. Analizar los cambios en la vía de señalización de la insulina inducidas por AP: p-Akt y p-mTOR.
3. Evaluar el efecto del AP sobre la actividad metabólica y la señalización de la insulina en cultivos primarios de corteza de rata comparado con las neuronas MSN diferenciadas.
4. Evaluar la participación de EROs en el efecto del AP la sobre actividad metabólica y la vía de señalización de la insulina.
5. Determinar si el AP es β -oxidado por las neuronas.
6. Analizar la participación de la activación de mTOR por ATP en el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina
7. Evaluar la activación de la señalización por GPR40/PKCs en las neuronas por AP.

8. Medir cambios en la concentración intraneuronal de Ca^{2+} en presencia del AP.
9. Estudiar la activación de PKC α inducida por AP.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo celular

Se trabajó con la línea celular del neuroblastoma humano MSN (SMS-MSN, RRID:CVCL_7135), derivadas del sitio de metástasis de cáncer de la médula espinal. Las células fueron una donación del Albert Einstein College of Medicine. Las células del neuroblastoma humano MSN (Reynolds et al., 1986) se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino inactivado a 60 °C (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA). Las células crecieron en una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂ a 37°C, con un número máximo de 20 pasajes de la línea celular. Veinticuatro horas después de plaquearlas, las células fueron diferenciadas a neuronas maduras mediante la adición de ácido retinoico (10 μM) y factor de crecimiento nervioso (50ng/ml) durante 5 días. El protocolo de diferenciación aplicado a la línea celular, es similar al reportado por Encinas y colaboradores y por nuestro propio grupo (Encinas et al., 2002; Ferrera & Arias, 2005). Al término del periodo de diferenciación, el medio de incubación fue reemplazado por medio fresco libre de SFB. Las células fueron incubadas con ácido palmítico (200 μM) o vehículo (etanol 10% BSA) por 1 hora a 37 °C y posteriormente se agregó insulina (10 μM) por 15 minutos para inducir la fosforilación de Akt en ausencia o presencia de ácido palmítico. La dosis usada de AP no resulta tóxica para

las células diferenciadas del neuroblastoma humano MSN y es cercana a la concentración de AP encontrada en el plasma de pacientes diabéticos o personas obesas.

7.2 Cultivo primario

Se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales de rata a partir de cerebros de embriones de 17 días de gestación. Se realizó la disección de cerebros libres de meninges y se mantuvieron en una solución de PBS/glucosa e incubados con 0.2% de tripsina a 37°C durante 30 minutos. Las células de las cortezas cerebrales se separaron mecánicamente usando una pipeta Pasteur y el pellet fue resuspendido en medio Neurobasal suplementado con B-12 (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA) y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células se sembraron en cajas Petri pre-tratadas con poli-L-lisina a una densidad de 1×10^7 . Tres días después, los cultivos fueron tratados con citosina arabinosida (10 mM) para inhibir el crecimiento de células no neuronales. Los cultivos se mantuvieron con 5% CO₂/95% O₂ a 37°C y se usaron 7 días después de haber sido sembradas. El medio fue reemplazado por medio fresco agregando AP o vehículo (200 μM) durante una hora.

7.3 Tinción de la proteína asociada a microtúbulos-2

Después del periodo de diferenciación, las células fueron lavadas tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído 1%/PBS por 5 minutos, se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se incubaron en 0.3% de Triton X100/PBS para su permeabilización durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se bloqueó con BSA 4%/PBS por una hora y fueron incubadas con el anticuerpo anti-MAP2 (1:1000, Millipore Cat# MAB378) durante

24 horas a 4°C. Posteriormente las células se lavaron tres veces con 0.3% Triton X-100/PBS, y fueron incubadas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti ratón (1:1000, Thermo Fisher Scientific Cat# A-21202) durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente el núcleo fue teñido con Hoechst (1:1000, Thermo Fisher Scientific Cat# H3570) en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células lavadas tres veces con PBS se cubrieron con medio de montaje fluorescente (DAKO). Para su visualización se usó microscopía confocal y las imágenes digitales se obtuvieron con el software NIS-Elements C imaging (Nikon).

7.4 Preparación del ácido palmítico

Se preparó una solución inicial de palmitato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO Cat# P9767) a 200 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO Cat# P9767) en etanol absoluto de grado molecular (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Este stock fue almacenado a -20°C y fue usado máximo dentro de dos meses. El día del experimento, se preparó solución de trabajo de 5mM en 10% BSA/PBS estéril y se incubó a 37°C hasta obtener una disolución completa. El BSA lo usamos como proteína transportadora para permitir que el ácido graso permanezca en solución y entre a la célula.

7.5 Análisis de actividad oxido-reductora mitocondrial mediante ensayo de reducción de MTT

Células MSN diferenciadas o neuronas corticales primarias de rata fueron sembradas en cajas de 24 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo. Se mantuvieron durante 1

hora en RPMI fresco sin SFB y se agregó AP o vehículo (200 μ M) durante 1 hora o 24 horas. Se adicionó insulina (10 μ M) durante 15 minutos y finalmente las células se incubaron durante 45 minutos con MTT-PBS (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) a 37°C en una relación de 1:10 (v/v). La reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a cristales de formazán por las reacciones de la cadena respiratoria mitocondrial es un indicador de la capacidad redox mitocondrial y ha sido utilizada como una medida de viabilidad celular o activación metabólica (Mosmann 1983). Posterior a la incubación con MTT, el medio fue retirado y las neuronas se solubilizaron en alcohol isopropílico (0.8 ml). Se cuantificó la absorbancia de cada muestra mediante el uso de un espectrofotómetro a 570 nm (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Para evaluar el efecto específico del AP sobre la actividad redox mitocondrial, previo a la incubación con MTT las células fueron tratadas con metilpalmitato (200 μ M), un análogo del AP no metabolizable en períodos cortos, durante 1 hora. En algunos experimentos, las células fueron pre-incubadas con el antioxidante mitoTEMPO (100 μ M), el cual se agregó simultáneamente con el AP o el vehículo.

7.6 Cuantificación de la relación NAD⁺/NADH

Para la cuantificación de la relación de NAD/NADH se usó un kit colorimétrico (Abcam, Cambridge, UK). Después del periodo de diferenciación de las células MSN, se incubaron con AP (200 μ M) durante una hora, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS frío. Se retiró el PBS y se agregó 400 μ l del buffer de extracción proporcionado por el kit. Se realizaron dos ciclos de congelamiento y descongelamiento (20 minutos en hielo seco

seguido de 10 minutos a temperatura ambiente) y posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf, el cuál fue mezclado durante 10 segundos y centrifugado a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se colectaron 200 μ l del sobrenadante y se calentaron a 60 °C durante 30 minutos. Las muestras y la curva estándar fueron colocadas en placas para ELISA de acuerdo a las instrucciones y diluciones indicadas por el proveedor. Se agregó en cada pozo 100 μ l del Mix de Enzima NAD cicladora y se incubaron durante 5 minutos. Después se agregó 10 ml de la solución reveladora y se incubaron durante 45 minutos para finalmente hacer la lectura de absorbancia a 450 nm. Cada experimento se realizó por duplicado.

7.7 Western blot

Se sembraron las células del neuroblastoma humano en platos de 35 mm a una densidad de 3×10^5 y los cultivos primarios de neuronas corticales a una densidad de 1×10^7 en platos de 60 mm (en éstas últimas sólo se evaluaron cambios en p-Akt). Después del periodo de diferenciación para el caso de las células MSN, los cultivos fueron expuestos a diferentes condiciones: PBS-10%BSA+etanol (vehículo), insulina (10 μ M, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, AP (200 μ M) por 1 hora, y AP seguido de 15 minutos de insulina. Para analizar el efecto de la inhibición de mTOR, las células fueron incubadas con rapamicina (100 nM, Sigma-Aldrich), y para ver la participación de la activación de PKCs, otras células fueron incubadas con el antagonista de PKC bisindolilmaleimida 1 (BIM) (1 μ M, Calbiochem Cat# 203290) durante 30 minutos previo a la exposición del AP. Las células fueron lisadas con el buffer de lisis RIPA (50 mM TRIS, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% NP-40; cóctel completo de inhibidores de proteasas de Roche Diagnostics) 200

μL por plato a 4°C . La concentración de proteína fue determinada usando el kit de análisis de proteína Bio-Rad DC. Se hirvieron las muestras en buffer de Laemmli durante 10 minutos y $20\ \mu\text{g}$ de proteína se cargaron en geles de SDS-10% acrilamida y se sometieron a electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Buckinghamshire, England) y se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS-Tween 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C : p-Akt S473 (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9271, RRID: AB_329825), Akt (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9272, RRID: AB_329827), p-PKC α S657 (1:500, Millipore Cat# 06-822, RRID: AB_310258), and β -actin (1:1000, Sigma-Aldrich Cat# A5316, RRID:AB_476743). Posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario: anti rabbit HRP IgG o anti-mouse HRP IGc (Santa Cruz), ambos a una concentración de 1:12 000 durante 2 horas a temperatura ambiente. La señal en la membrana fue revelada usando un sustrato de quimioluminiscencia ECL (Millipore) en placas Kodak X-Omat. La señal de las bandas fue analizada por densitometría mediante el software ImageJ. Los datos se normalizaron dividiendo el valor obtenido de cada banda entre el valor correspondiente a su actina la cual fue usada como control de carga. La relación obtenida se expresó como porcentaje respecto al control (vehículo) de cada experimento.

7.8 RT-PCR

Se obtuvo el ARN total de las células diferenciadas MSN de acuerdo al protocolo establecido por el método de TRIzol (Life Technologies). El ADNc se sintetizó a partir de 1000 ng de ARN con primers oligo (dT) utilizando el kit de Sistema de Transcripción

Reversa ImProm-II (ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, WI). La cuantificación del ARN y ADNc se realizó usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para evaluar la expresión del gen Gpr40 se usó el kit de PCR “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Thermo Fisher Scientific Cat# 4368577). La secuencia de los primers fueron las siguientes: F. 5'-CCA GCT TCC TGT ACC CCA AT -3' y R. 5'-GTC ACC AGC GGA TTA AGC AC -3' (Integrated DNA Technologies). El producto ya amplificado se sometió a electroforesis en geles de agarosa 1.5% y se obtuvieron las imágenes con luz ultravioleta. Por cada muestra experimental se realizaron 3 réplicas técnicas, el control negativo usado fue agua destilada libre de ARNasas y para el control positivo se usó ARNm aislado a partir de leucocitos.

7.9 Medición de Ca²⁺

Los niveles de Ca²⁺ se midieron usando el indicador Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific Cat# F14201) en combinación con microscopía de fluorescencia. Las células MSN se sembraron en cajas Petri de 35mm con cubreobjetos de 25 mm a una densidad de 1×10^5 células por plato. Después del periodo de incubación, las células se incubaron con RPMI sin suero adicionando 5 μ M Fluo-4 AM más 1% de ácido plurónico durante 45 minutos a 37°C. Las células se lavaron y se incubaron con RPMI sin SFB durante 15 minutos a 37°C. Para la adquisición de las imágenes el portaobjetos con células fue montado y las células se mantuvieron en solución de Ringer-Krebs (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa, 1.8 mM CaCl₂, 500 μ M EGTA, pH 7.4) con o sin Ca²⁺ dependiendo el interés del experimento y fueron expuestas a los siguientes tratamientos: 200, 250 and 300 μ M de AP; 100 μ M del agonista de GPR40,

DHA (Sigma-Aldrich Cat# D2534); 100 μ M del inhibidor de carnitina palmitoiltransferasa, etomoxir durante 45 minutos (Cayman Chemical Cat# 11969) más AP; 10 U/ml de la enzima que hidroliza ATP, apirasa por 10 min (Sigma-Aldrich Cat# A6410) más AP; 100 μ M del activador de los canales de K^+ , diazóxido por 10 min (Sigma-Aldrich Cat# D9035) más AP; and 10 μ M del antagonista de GPR40, GW1100 por 10 min (Cayman Chemical Cat# 10008908) más DHA. La dinámica de Ca^{2+} se midió por células de manera individual (20 células por cultivo y condición) mediante el uso del microscopio Olympus® de campo completo invertido IX81 con un objetivo de aceite en inmersión NA 1.42 de $\times 60$ 1.42, sistema de iluminación MT-20, el filtro de excitación fue de 484/25 nm y el filtro de emisión de 520/40nm con una cámara EMCCD iXon-897 (Andor Technology, South Windsor, CT, USA). Las imágenes se adquirieron cada dos segundos en un total de veinte minutos de registro, mediante el software de Olympus Cell-R y para el análisis de las imágenes se utilizó Fiji (Schindelin et al. 2012). La señal de fluorescencia obtenida se normaliza contra el nivel basal de fluorescencia (F/F_0) detectada durante los primeros 3 minutos de registro. Para la comparación del incremento de Ca^{2+} entre cada condición experimental, se obtuvo el valor de la señal máxima de fluorescencia ($F_{max}-F_{basal}$, ΔF) y fue con estos valores que se realizó el análisis estadístico. Cada experimento se realizó por triplicado y por réplica se analizaron 3 campos por cultivo y 20 células por campo.

7.10 Cuantificación de ATP

Para medir los niveles de ATP se usó el Kit de detección de ATP basado en luminiscencia (Abcam). Las células MSN se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad de 83×10^3

por pozo. Después del periodo de diferenciación, las células se incubaron con las siguientes condiciones:

- insulina 5 minutos
- AP (6 minutos)
- etomoxir (45 minutos) + AP (6 minutos)
- AP (1 hora)
- Etomoxir (45 minutos) + AP (1 hora)
- AP (1 hora) + insulina 15 minutos

Posterior a los tratamientos, se agregó la solución de detergente proporcionada por el kit y las células se mantuvieron en agitación durante 5 minutos. Después se agregó la solución del sustrato que contiene la luciferasa y luciferina y se pusieron en agitación por otro 5 minutos. Finalmente la caja de 96 pozos se cubrió con aluminio y se mantuvo en oscuridad durante 10 minutos. La señal de luminiscencia se midió usando el lector de microplato Synergy™ H4 híbrido.

7.11 Análisis estadístico

Todos los datos fueron expresados como la media \pm S.E.M. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la prueba post hoc Dunnett; ANOVA de dos vías seguida por la prueba de comparación múltiple de Tukey o la prueba t de Student de acuerdo a lo indicado en cada pie de figura.

La significancia considerada fue de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados y graficados mediante el software GraphPad Prism 8.0. Los resultados son expresados como el porcentaje relativo al grupo control (vehículo).

8. RESULTADOS

8.1 Cambios metabólicos en la neurona por la exposición al AP.

Las células humanas diferenciadas del neuroblastoma MSN fueron usadas como el principal modelo de estudio en este trabajo. La diferenciación neuronal hacia un fenotipo maduro se muestra a través de la inmunodetección del marcador de citoesqueleto MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos 2) (**Figura 5 A**). Para analizar el efecto del AP sobre la actividad metabólica medimos el efecto a corto y largo plazo (1 hr o 24 hrs respectivamente) de la exposición al ácido graso cuantificando la actividad redox mitocondrial a través de la reducción del compuesto MTT en presencia de insulina. Dado que se ha reportado que 200 μM de AP es una concentración parecida a la contenida en el plasma de pacientes con enfermedades metabólicas y que en modelos de cultivo celular no causa toxicidad (Calvo-Ochoa, Sánchez-Alegría, Gómez-Inclán, Ferrera, & Arias, 2017; Clore et al., 2002; Flores-León, Pérez-Domínguez, González-Barrios, & Arias, 2019; Grapov, Adams, Pedersen, Garvey, & Newman, 2012), se utilizó esta concentración en todo el estudio.

Primero, las células que fueron tratadas durante 15 minutos con insulina mostraron un incremento significativo en la reducción de MTT en comparación con las células control, lo cual confirma que la señalización de la insulina favorece la vía glucolítica al regular la actividad enzimática de algunas proteínas como la fosfructocinasa (**Figura 5B**). Cuando las células se trataron con AP por 1 hora, también presentaron un incremento significativo en la actividad oxidoreductora mitocondrial, el cual ya no se observó cuando las células se incubaron con el ácido graso durante 24 horas. Esta activación metabólica tampoco se observó a tiempos cortos en presencia del metilpalmitato, un análogo del AP no metabolizable, lo que sugiere que el AP podría ser usado como sustrato energético por las células. La activación metabólica inducida por el AP fue transitoria ya que a 24 horas ya no fue posible observar el efecto sobre la activación mitocondrial. Interesantemente, la incubación con el AP durante 1 hora previo a la estimulación con insulina, impidió la actividad oxido-reductora mitocondrial dependiente de insulina, lo cual ya no se observó con 24 horas de incubación con el AP más insulina (**Figura 5 B**).

En resultados previos del laboratorio se demostró que la activación mitocondrial inducida por el AP es independiente del contenido de glucosa en el medio de incubación, lo cual sugiere que este ácido graso pudiera ser usado como sustrato energético (Calvo-Ochoa, Tesis de Doctorado). Adicionalmente, se evaluó la relación NAD/NADH para determinar el estado redox de las neuronas en presencia de insulina y del AP. Mientras que la insulina disminuyó de manera significativa la relación NAD/NADH, el AP mostró sólo una tendencia a disminuir esta relación (**Figura 5 C**). Estos resultados sugieren que tanto la insulina como el AP cuando se agregan de manera independiente incrementan la actividad

metabólica de la neurona a tiempos de 1 hora, pero al incubar las células con el AP previo a la insulina se impide la actividad oxido-reductora mitocondrial dependiente de insulina.

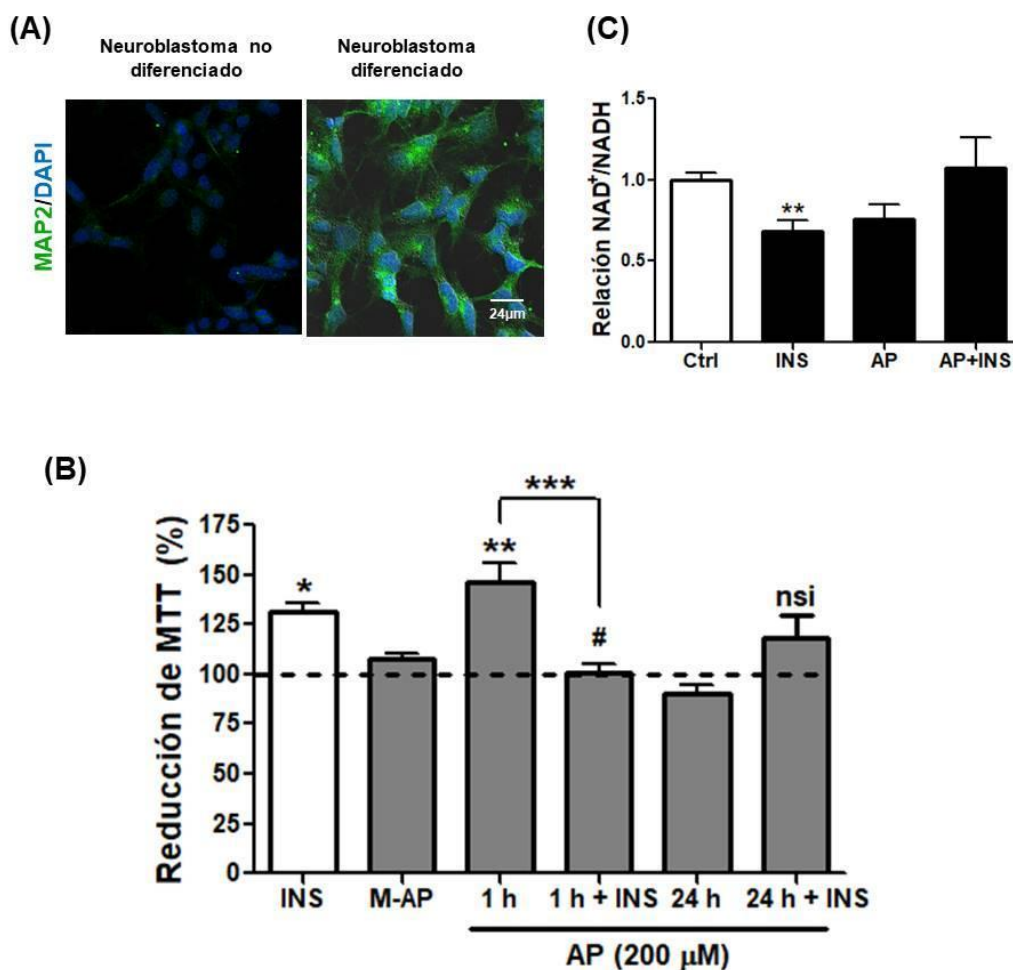


Figura 5. Efecto de la exposición al AP en la activación metabólica de la neurona.

Células humanas MSN teñidas con MAP2 después de la diferenciación (A) La activación mitocondrial fue evaluada por reducción de MTT después de insulina (15 min), metilpalmitato (M-AP), AP (1 h o 24 h) o AP+insulina (1 h y 24 h) (B). La relación de NAD⁺/NADH fue evaluada después de la estimulación con insulina por 15 min o exposición al AP por 1 h (C). Los datos expresan el porcentaje promedio \pm SEM de 3 a 5 experimentos independientes por duplicado cada uno. La estimulación con insulina (INS) es comparada con neuronas no-tratadas (línea punteada, *p

< 0.05), (# no significativo con respecto al control), (nsi: no significativo con respecto a la insulina) (**p < 0.01, *p < 0.05).

8.2 El AP inhibe la vía de señalización insulina/PI3K/Akt

Dado que la exposición al AP por periodos cortos (1 hora) impidió la activación mitocondrial dependiente de insulina, evaluamos si durante este periodo de exposición también generaba una disminución de la señalización por insulina. Para ello, se analizaron los cambios en el estado de fosforilación de la proteína Akt inducida por insulina, en el residuo de activación, S473. Observamos que después de la estimulación con insulina, los niveles de fosforilación de Akt se incrementaron significativamente en comparación con las neuronas tratadas con vehículo o con AP. Sin embargo cuando las células se pre-incubaron con AP durante 1 hora, se perdió el efecto en la activación de Akt mediada por insulina (**Figura 6 A**). Para confirmar que este efecto inhibitorio de la vía de la insulina era dependiente del metabolismo del AP, evaluamos nuevamente los cambios en la actividad de Akt pero en neuronas pre-incubadas con metilpalmitato, el homólogo del AP no metabolizable a tiempos cortos. Interesantemente, el metilpalmitato no tuvo un efecto inhibitorio sobre la activación de Akt insulina-dependiente, sugiriendo que es el metabolismo del AP, el que está involucrado en la disminución de la señalización por insulina (**Figura 6 B**).

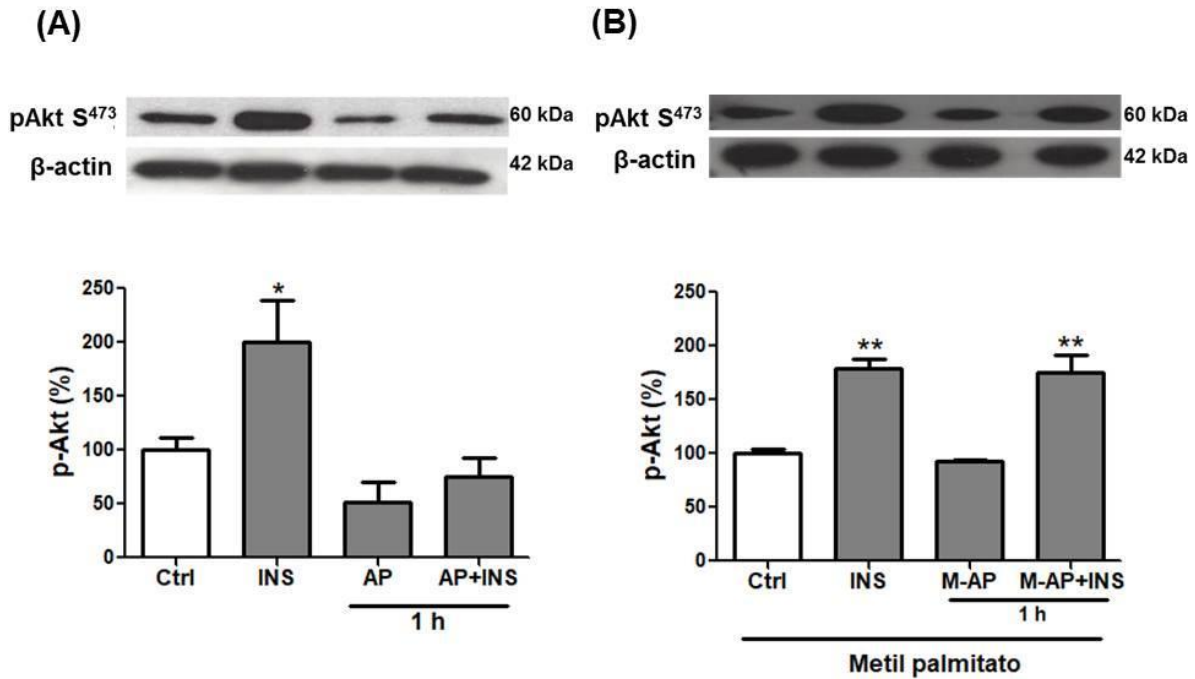


Figura 6. La exposición al AP inhibe la señalización de la insulina.

Western blot de la proteína p-Akt S473 de células de neuroblastoma humano diferenciado después de 1 hora de exposición al AP (200 μM) en la ausencia o presencia de 15 minutos de insulina (10 μM) (A). Para analizar el efecto selectivo del AP en la señalización de la insulina evaluamos p-Akt S473 en la presencia de metil palmitato (B). Se muestran western blots y análisis densitométrico. Porcentaje promedio ± SEM de 5 experimentos independientes

*p < 0.05, **p < 0.01, vs. Ctrl.

Aunque las neuronas estudiadas provienen de una línea celular neoplásica, existen muchos reportes en los que se demuestra que la diferenciación del neuroblastoma provee de neuronas con fenotipo y comportamiento metabólico semejante a neuronas maduras (Carpentieri et al., 2015). Aun así, para corroborar que el efecto inhibitor del AP sobre la señalización de la insulina no dependía del antecedente tumoral de la línea celular empleada, utilizamos cultivos primarios de neuronas corticales de rata. Al igual que lo

obtenido con el neuroblastoma diferenciado, cuando las neuronas corticales se incubaron una hora con el AP, se impidió la actividad oxido-reductora mitocondrial mediada por insulina, así como la señalización de insulina/PI3K/Akt (**Figura 7 A y B**). Estos resultados demuestran que en neuronas, el tratamiento con AP impide la actividad mitocondrial dependiente de insulina y la señalización de la vía de esta hormona. Por lo tanto, procedimos a evaluar los mecanismos involucrados en estos efectos.

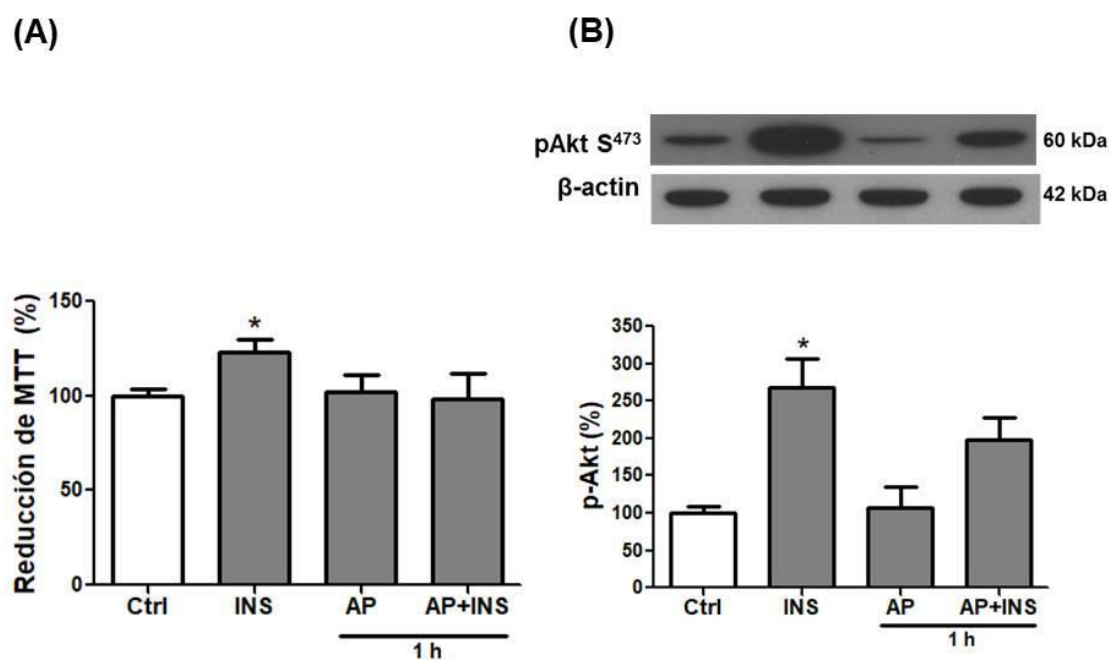


Figura 7. La exposición al AP inhibe la señalización de la insulina en neuronas corticales.

La activación mitocondrial fue evaluada por reducción de MTT después insulina (15 min), AP (1 h) o AP +insulina (1 h) (**A**). Western blot representativo y análisis densitométrico de p-Akt S473 después de las mismas condiciones (**B**) Se muestra porcentaje promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes * $p < 0.05$, vs. Ctrl.

8.3 El efecto inhibitor del AP sobre la vía de la insulina requiere de la activación de mTOR

La proteína mTOR (mammalian target of Rapamycin) es una serina/treonina cinasa que funciona como un sensor de nutrientes y regulador metabólico. Su activación sucede río abajo de la señalización de la vía insulina/PI3K/Akt, sin embargo también se ha reportado que el metabolismo de los ácidos grasos puede activar a mTOR promoviendo un estado de resistencia a la insulina por la fosforilación del IRS en residuos de serina mediada por S6K, la cual, a su vez es activada por mTOR (H. Oh et al., 2013; Ono et al., 2008; Tremblay et al., 2007). Conociendo esto, se evaluó si el tratamiento con AP por una hora podría activar mTOR. Para ello analizamos cambios en los niveles de fosforilación de mTOR en la S2448, un residuo de activación necesario para la formación del complejo mTORC1 e indicador de activación de la señalización de esta cinasa (Rosner, Siegel, Valli, Fuchs, & Hengstschläger, 2010). Posterior a la estimulación con insulina se observó un incremento significativo en los niveles de fosforilación de mTOR. Interesantemente, también se observó que mTOR fue activada por el tratamiento con AP de una manera independiente a la vía de la insulina (**Figura 8 A**). Posteriormente, al pre-incubar a las neuronas con rapamicina (100nM), el inhibidor específico de mTOR, se impidió la activación de mTOR por insulina y por AP (**Figura 8 B**). Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los cuales el AP puede impedir la señalización de la insulina implica la participación de la cinasa mTOR.

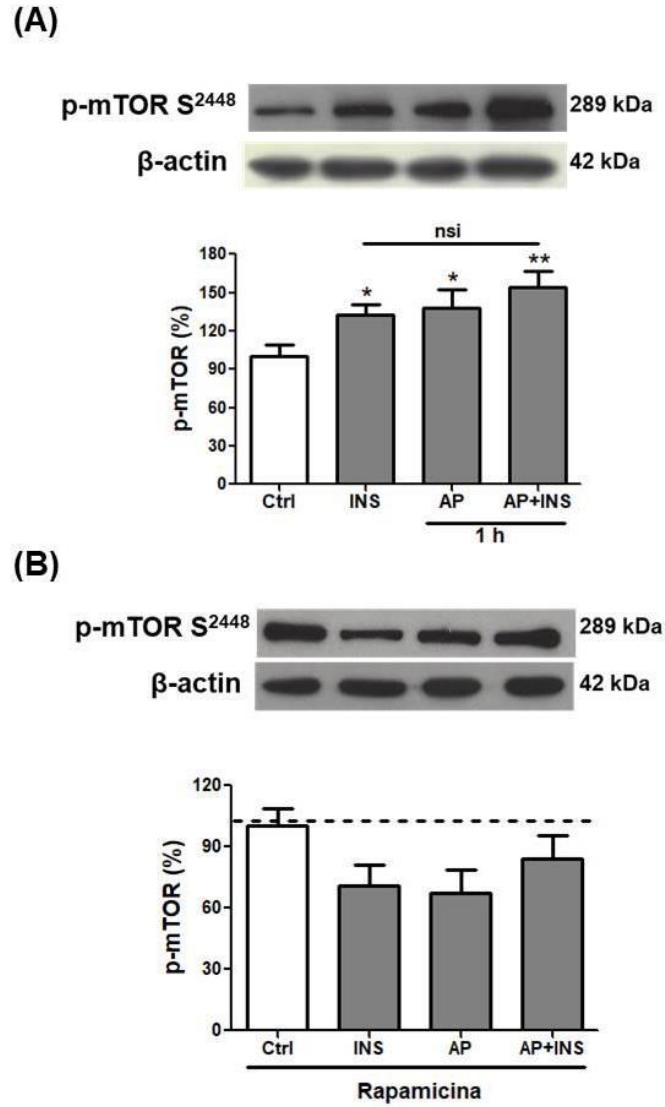


Figura 8. Efecto de la insulina y AP en la activación de mTOR.

Western blot y análisis densitométrico de p-mTOR S2448 **(A)** de células de neuroblastoma humano diferenciado expuestas al AP (200 μ M) durante 1 h en ausencia o presencia de insulina por 15 min y en la presencia del inhibidor de mTOR, rapamicina (100 nM) **(B)**. Las gráficas representan la comparación entre células control y las estimuladas con insulina (15 min), AP (1 h) o no tratadas (línea punteada). Se muestran los datos como porcentaje promedio \pm SEM de 4 o 5 experimentos independientes que fueron realizados por duplicado * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ tratamientos vs. control; nsi: no significativo con respecto a la insulina; línea punteada: células sin rapamicina.

8.4 El AP incrementa la producción de EROs en la mitocondria e impide la señalización de la insulina

Se ha reportado que la señalización de la insulina requiere un pequeño pulso de liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que promueve la autofosforilación del receptor de insulina y con ello su cascada de su señalización (Mahadev et al., 2001; Persiyantseva et al., 2013; Pomytkin & Kolesova, 2003). Sin embargo, los ácidos grasos en concentraciones patológicas generan un incremento sostenido en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en la mitocondria que puede afectar la señalización de la insulina (Anderson et al., 2009; Bonnard et al., 2008; Koves et al., 2008). Dado que los resultados anteriores sugerían que el AP podría estar siendo β -oxidado por las células diferenciadas MSN, quisimos evaluar si otro mecanismo de acción del AP se debía al incremento en la producción de EROs. Para estudiar esta posibilidad, las neuronas se pre-incubaron con mitoTEMPO, un anti-oxidante específico para la mitocondria. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con este anti-oxidante mitocondrial inhibe la activación mitocondrial dependiente de insulina pero no la generada por el AP, esto con respecto a los resultados mostrados anteriormente en la Figura 5B (**Figura 9 A**). Además, el mito-TEMPO revirtió el efecto inhibitorio del AP sobre la actividad metabólica mediada por insulina y la fosforilación de Akt que previamente se había mostrado en la Figura 6 A. (**Figura 9 B**). Estos resultados apoyan que la actividad metabólica mediada por insulina requiere de un pulso de liberación de EROs y que el tratamiento con AP a una hora inhibe la señalización de la insulina y la activación mitocondrial dependiente de la hormona incrementando los niveles de EROs mitocondriales.

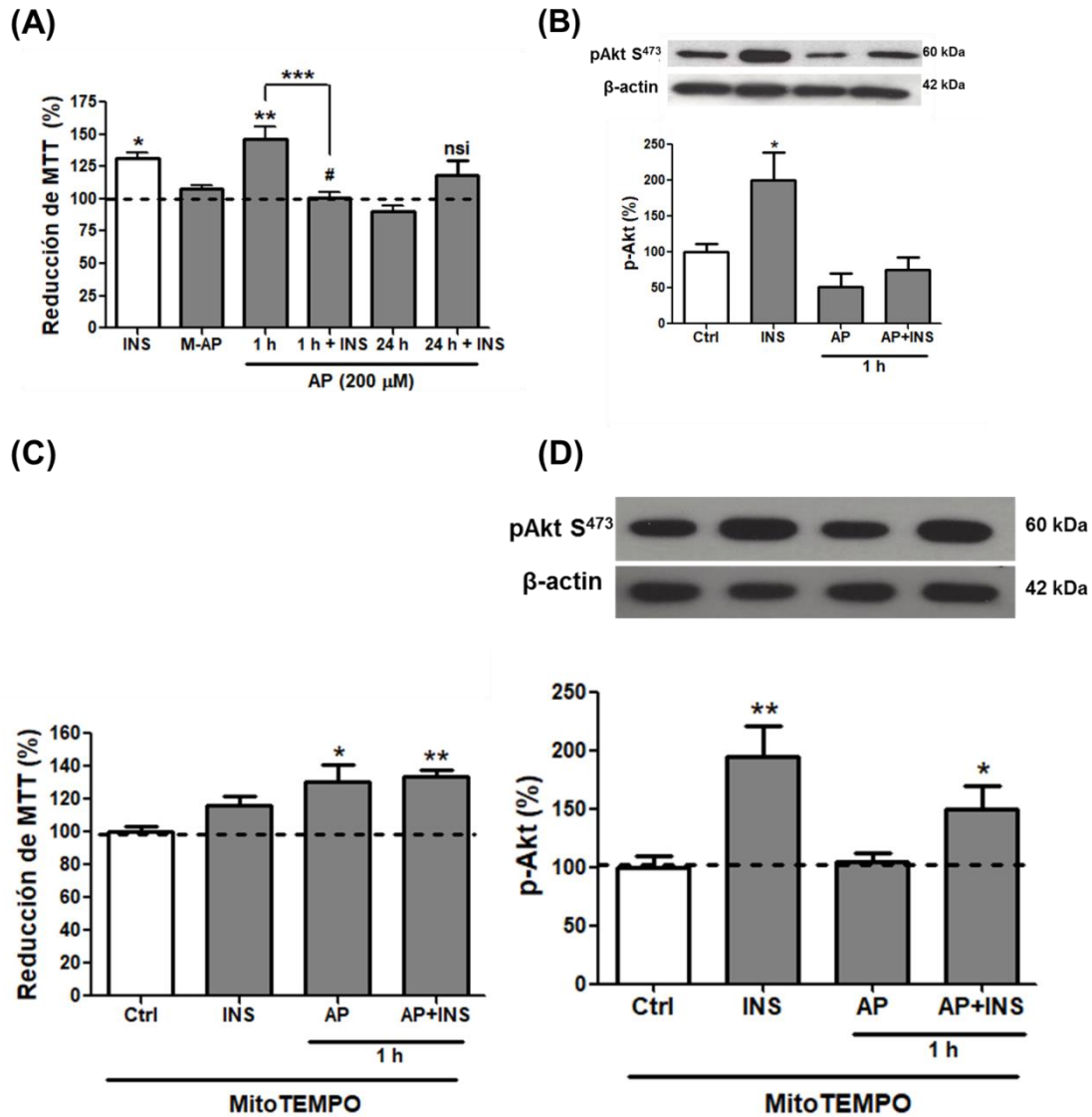


Figura 9. El efecto inhibitor del AP sobre la señalización de la insulina es mediada por EROS mitocondrial.

En la figura A y B se muestran los resultados reportados en las figura 5B y 6A donde la preincubación con AP a 1 hr inhibió la reducción de MTT y el incremento en la fosforilación de Akt dependiente de insulina. La activación mitocondrial fue analizada por reducción de MTT en células control y células estimuladas con insulina, AP o AP + insulina en la presencia de un antioxidante específico de mitocondria, mitoTEMPO (10μM) (C). La reducción basal de MTT es indicada por una línea punteada y las células control en la presencia de mitoTEMPO son comparadas con estimulación con insulina, AP o AP + insulina. Western blot de p-Akt S473 en células incubadas con mitoTEMPO en respuesta a la estimulación con insulina, AP y AP + insulina (D). Los datos

mostrados son el porcentaje promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes realizados por triplicado. *p < 0.05, **p < 0.01 con respecto al control.

En conclusión, en esta primera parte del proyecto se demostró que el AP impide la actividad metabólica mediada por insulina y la señalización de la vía de insulina/PI3K/Akt. También demostramos el papel de la producción de EROs y activación de mTOR como dos mecanismos involucrados en los efectos inhibidores del AP, además de sugerir la posibilidad de que el AP pudiera estar siendo β -oxidado por la neurona. Lo anterior con base en los hallazgos que demostraron que el AP aumenta la reducción de MTT, disminuye la relación NAD/NADH y activa al sensor metabólico mTOR de manera independiente a la señalización de la insulina.

8.5 El AP reduce la señalización de la insulina a través de la activación de mTOR y PKCs

Dado que mTORC1 es un sensor metabólico y que se observó su activación de manera dependiente del AP (**Figura 8**), estudiamos su participación en el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina, mediante el diseño experimental que se muestra en la figura 10 A. Para ello, evaluamos cambios en la actividad de Akt determinando los niveles de p-Akt S473 cuando las células se estimularon con insulina en presencia del AP y cuando se inactivó mTOR con rapamicina. Interesantemente, la rapamicina impidió el efecto inhibitorio del AP sobre la activación de Akt dependiente de insulina (**Figura 10 B**). Se conoce que algunas PKCs son cinasas efectoras de mTOR (Moschella et al. 2007) y que

éstas también inhiben mediante fosforilación a componentes de la vía de la insulina impidiendo la señalización de la hormona (Benoit et al., 2009; Li, Vienberg, Bezy, O'Neill, & Kahn, 2015), evaluamos su participación en el efecto inhibitorio del AP. Para ello, las células se trataron con bisindolilmaleimida 1 (BIM), un inhibidor general de PKCs, previo al tratamiento con AP y evaluamos los cambios en el contenido de p-Akt S473 en presencia de insulina. Encontramos que en presencia de BIM no se observó el efecto inhibitorio del AP y que, inclusive, los niveles basales de p-Akt S473 disminuyeron significativamente (**Figura 10 B**). Estos cambios en p-Akt con los diferentes tratamientos se mantuvieron cuando se comparó contra los niveles totales de Akt (**Figura 10C**) y al hacer la relación p-Akt/Akt (**Figura 10 D**). Lo anterior sugiere que en presencia del AP se activan tanto PKCs como mTOR y que estas cinasas participan en su efecto inhibitorio sobre la vía de la insulina. De manera adicional se sugiere que la actividad celular de PKCs mantienen cierta activación basal de Akt, al menos en estas células.

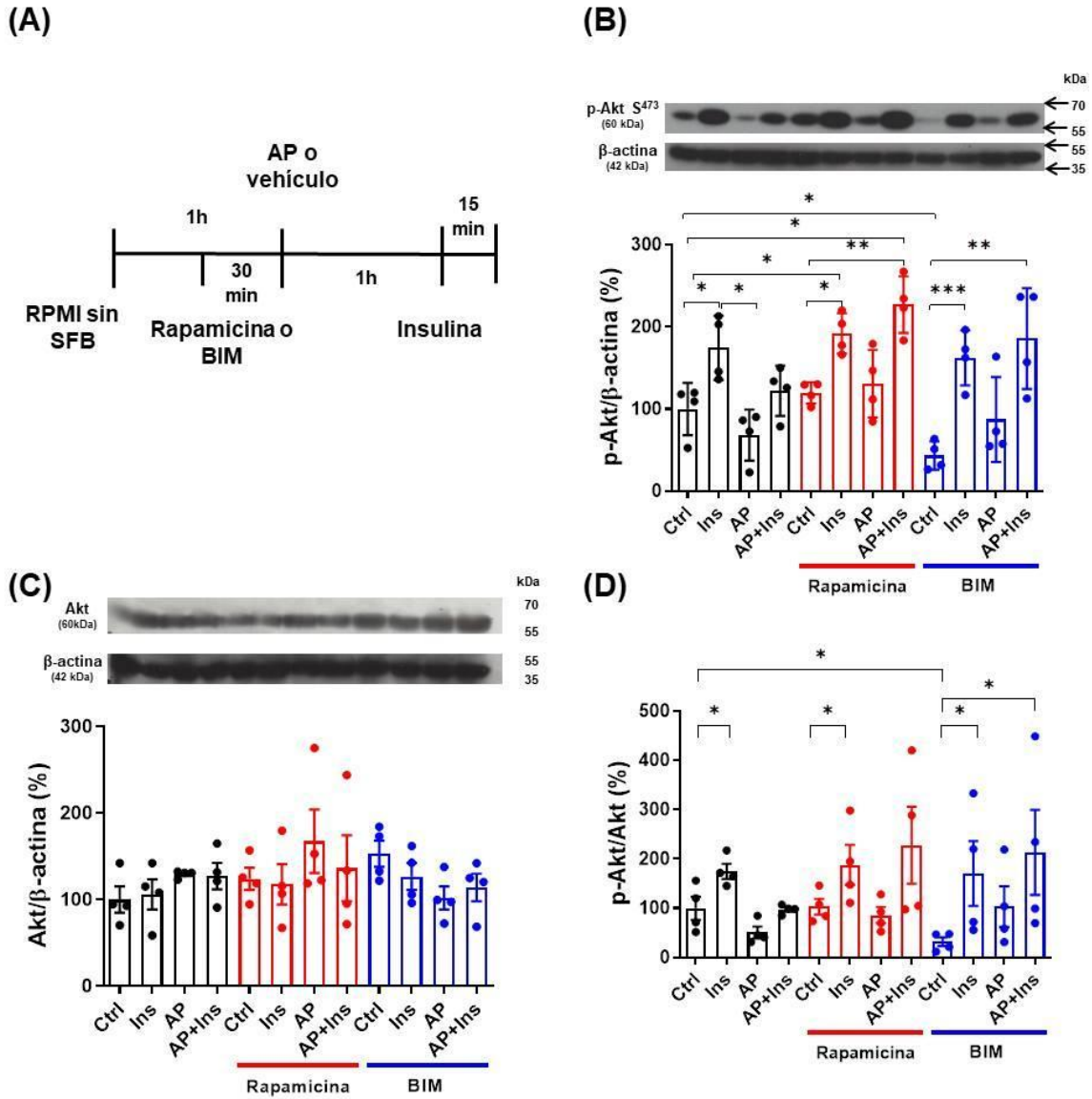


Figura 10. La resistencia a la insulina en la neurona causada por el AP es bloqueada por la inhibición de mTOR y PKC.

Células del neuroblastoma humano MSN fueron tratadas con AP, rapamicina (100 nM) o BIM (1 μ M). Las células fueron estimuladas con insulina (15 min) en la presencia o ausencia de 200 μ M de AP que fue incubado 1 hora antes de la insulina. p-Akt S473 fue detectada por western blot. Se muestra el diseño experimental (A) y el análisis densitométrico de p-Akt S473 normalizado con actina (B), total (C) y la relación p-Akt/Ak total (D). Porcentajes promedios \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguida por comparaciones múltiples de Tukey. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

8.6 El AP induce movilización de Ca^{2+} en neuronas

Se sabe que las PKCs clásicas son activadas por Ca^{2+} y que en tejidos periféricos el AP puede movilizar Ca^{2+} mediante la activación del GPCR sensible a ácidos grasos, GPR40 (Shapiro et al., 2005). Por lo tanto, quisimos evaluar si en el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina también participaba este mecanismo. Para determinar la presencia de GPR40 en el neuroblastoma humano diferenciado, usamos RT-PCR punto final comparando con el contenido del receptor en célula de leucocitos, que usamos como control positivo. En la **figura 11 A**, se muestran los resultados por medio de los cuales confirmamos la presencia del GPR40 (banda blanca) en el control positivo y en las células del neuroblastoma humano diferenciado (carriles 1-3), no así en el control negativo.

Después evaluamos si el AP en tres diferentes concentraciones (200, 250 y 300 μM) era capaz de incrementar los niveles de Ca^{2+} a través de la activación de GPR40 mediante el uso de Flúo-4 AM y microscopía de fluorescencia. En la **figura 11 B** se muestra el diseño experimental utilizado así como la línea temporal de los tratamientos. Nuestros resultados mostraron que la administración del AP incrementa de manera significativa los niveles de Ca^{2+} intracelular a las tres dosis usadas. De manera interesante se demostró que para las concentraciones de 200 y 300 μM , el incremento máximo se obtiene aproximadamente a los 6 minutos de la administración del AP y que este incremento tiene un comportamiento sostenido (**Figura 11 C, D**). Dado que la movilización de Ca^{2+} fue muy distinta a la descrita en células de tejido periférico (incremento rápido y de duración corta), comparamos la elevación de Ca^{2+} dependiente del AP con otro agonista del GPR40, el ácido docosahexanoico (DHA), que ya es bien conocido como un ligando endógeno del

receptor. En estas condiciones, el DHA (100 μM) también generó un incremento significativo de Ca^{2+} en las neuronas, con una cinética similar pero en menor intensidad que el AP (Figura 11 E, F).

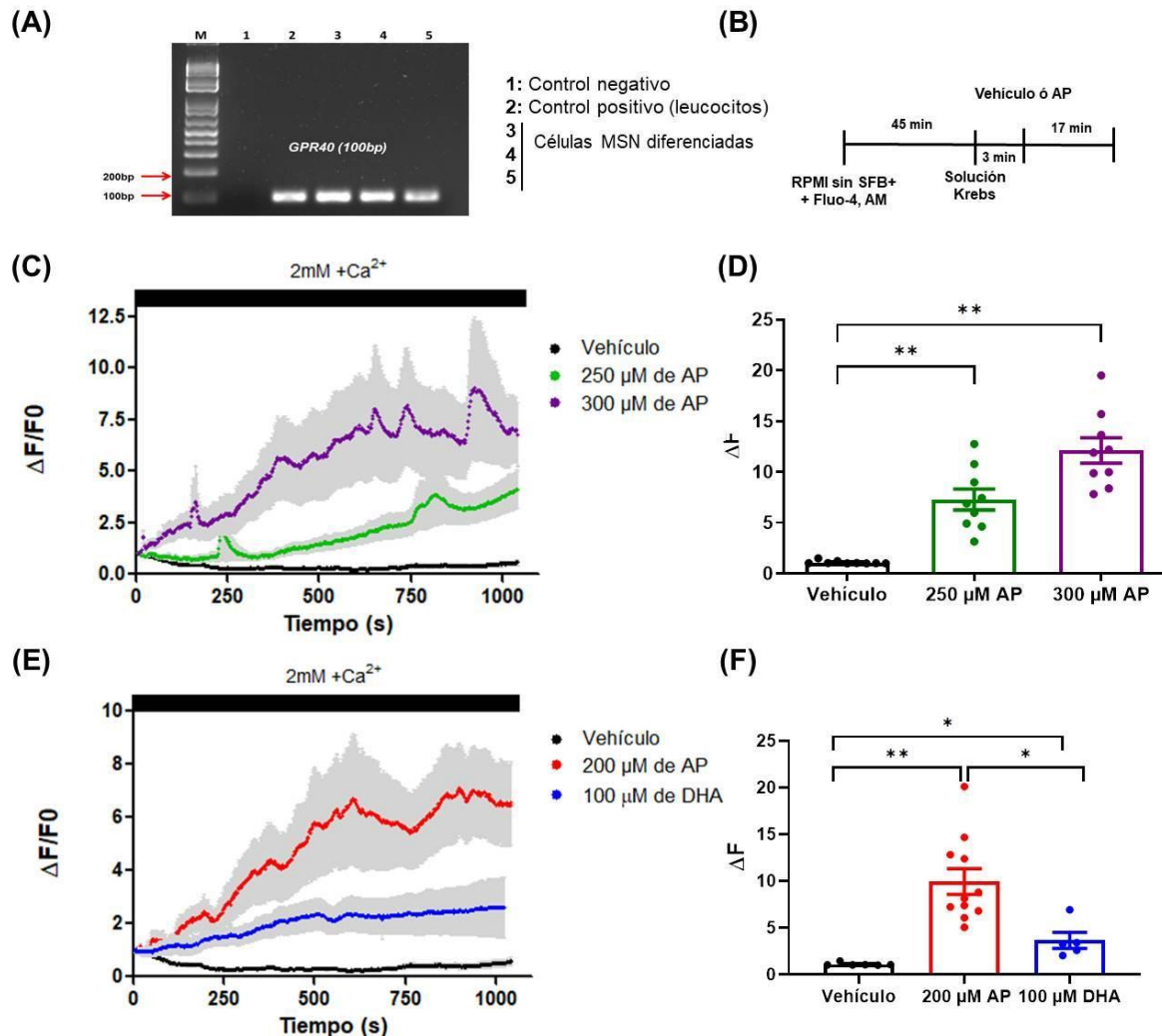


Figura 11. El AP incrementó el Ca^{2+} intracelular en las células neuronales.

La concentración de Ca^{2+} intracelular en las células MSN diferenciadas fue evaluada mediante Fluo-4 AM en respuesta al AP y ácido docosahexanoico (DHA). Niveles de expresión de GPR40 en células neuronales, con el control negativo (agua destilada) y control positivo (ARNm de leucocitos) (A). Protocolo experimental y línea temporal (B). Cambios en Ca^{2+} intracelular inducido por AP a 300 y 250 μM expresados como el incremento promedio \pm SEM de los niveles de fluorescencia normalizados vs basal ($\Delta F/F_0$) (C). Cuantificación del incremento de Fluo-4 AM

calculado por la diferencia en los niveles de fluorescencia entre $F_{\max}-F_{\text{basal}}$ (ΔF) (**D**). Comparación entre la cinética de Ca^{2+} en la presencia de 200 μM de AP y DHA 100 μM (**E**) e incremento de la relación de Fluo-4 AM (ΔF) (**F**). Los resultados son expresados como el promedio \pm SEM de 9 cultivos independientes realizados y 20 células por condición por triplicado. El análisis estadístico fue ANOVA seguida de la prueba post hoc Dunnett $*p < .05$, $**p < .01$, $n = 9$

8.7 El AP promueve la entrada de Ca^{2+} por un mecanismo independiente a la señalización de GPR40

Dada la cinética de movilización del Ca^{2+} por el AP, que mostró un patrón sostenido y de larga duración, quisimos evaluar si esta movilización de Ca^{2+} se debía a la movilización de pozas endógenas o bien, a una entrada del Ca^{2+} extracelular. Para ello, las neuronas fueron incubadas en solución Ringer-Krebs sin Ca^{2+} durante el registro. Interesantemente, en esta condición el AP no incrementó los niveles de Ca^{2+} citosólico y su efecto regresó al agregar nuevamente Ca^{2+} al medio (**Figura 12 A, B**), indicando que el AP promueve la entrada de Ca^{2+} y no su salida del retículo endoplásmico por activación de GPR40, como se había hipotetizado. Para fortalecer esta conclusión, se analizó la movilización de Ca^{2+} generada por el DHA en medio libre de Ca^{2+} . En esta condición el DHA mantuvo el incremento intracelular de Ca^{2+} observado previamente, y además, éste aumento fue impedido cuando las células se pre-incubaron con el antagonista del receptor GPR40, GW1100 (**Figura 12 C, D**). Estos resultados confirman que el DHA incrementa el Ca^{2+} citosólico por la señalización a través del GPR40, pero el AP promueve la entrada de Ca^{2+} externo por un mecanismo independiente al receptor GPR40.

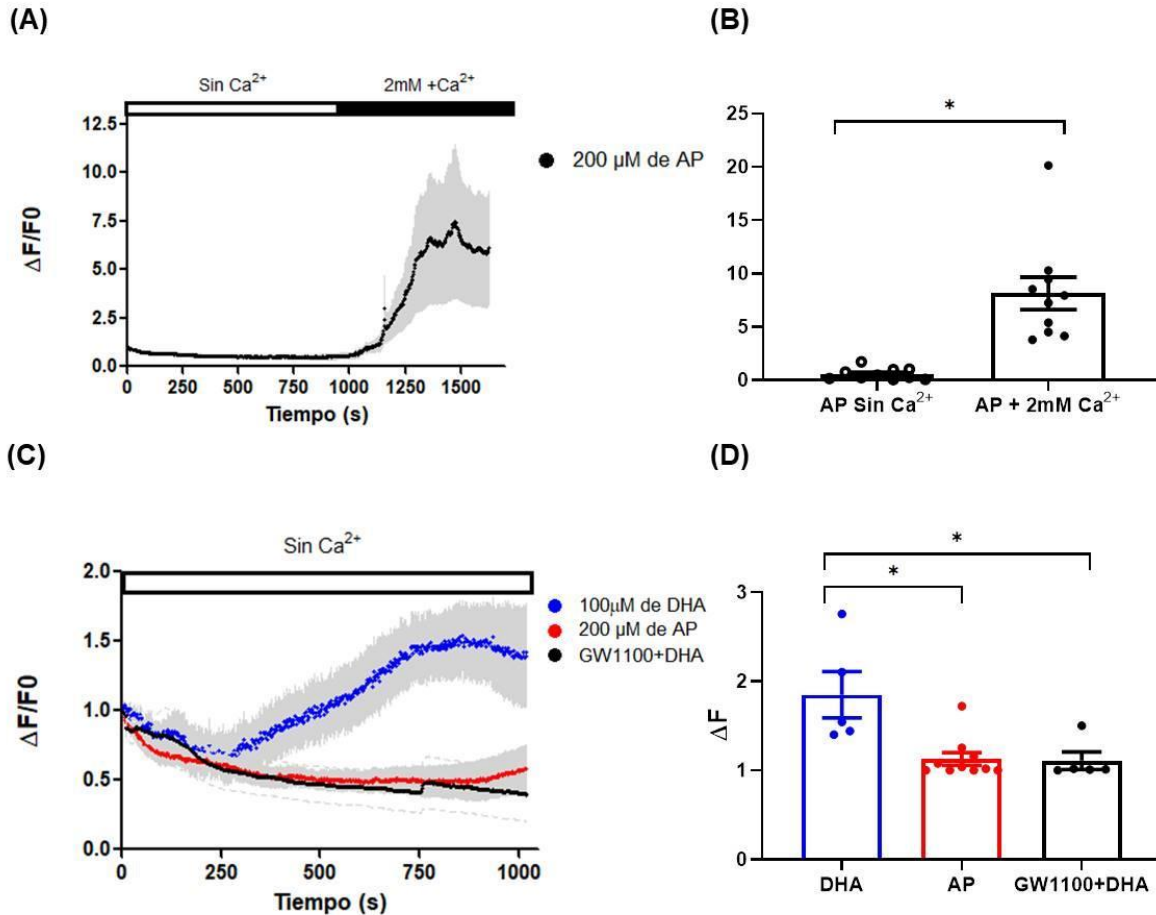


Figura 12. El AP incrementó los niveles de Ca^{2+} intracelular de manera independiente a la activación de GPR40.

Relación de la fluorescencia de Fluo-4 AM en respuesta al AP y DHA en ausencia o presencia de Ca^{2+} extracelular. La exposición al AP incrementa la concentración de Ca^{2+} interno sólo en la presencia de Ca^{2+} externo (A), trazos y cuantificación de los cambios promedio (B). El incremento de Ca^{2+} dependiente de DHA fue completamente bloqueado en la presencia del antagonista del GPR40, GW1100 (C), trazos y cuantificación del cambio promedio (D). Los datos muestran el promedio \pm SEM de 10 (A, B) y 5 (C, D) experimentos independientes cada uno con 20 células por condición y realizados por triplicado. El análisis estadístico fue una prueba t de Student para muestras pareadas (B) y ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc Dunnett (D) $*p < .05$, $n = 10$ (A, B), $n = 5$ (DHA), $n = 10$ (AP), $n = 5$ (GW1100 + DHA)

8.8 El ATP generado de la β -oxidación del AP regula la entrada de Ca^{2+}

Se sabe que el ATP puede regular la entrada de Ca^{2+} por dos mecanismos: cerrando los canales de K^+ sensibles a ATP y promoviendo la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje (VGCCs, por sus siglas en inglés) posterior a la despolarización; y/o produciendo la activación de canales purinérgicos después de la liberación de ATP (Huopio, Shyng, Otonkoski, & Nichols, 2002; Kishore et al., 2011; North, 2002). Dado que en neuronas hipotalámicas los ácidos grasos saturados son capaces de despolarizar a las células incrementando el ATP a través de su β -oxidación (Jo, Su, Gutierrez-Juarez, Chua, & Jr., 2009), quisimos analizar si en el presente modelo el AP aumentaba la producción de ATP lo que induciría la entrada de Ca^{2+} por cualquiera de los dos mecanismos descritos arriba.

Ya se había demostrado en nuestro sistema que el AP incrementa la reducción de MTT y disminuye la relación NAD/NADH, sugiriendo fuertemente que el AP es utilizado como metabolito energético. Se decidió comprobar si la β -oxidación del AP era llevada a cabo por las neuronas y si por este mecanismo incrementaba los niveles de ATP. Nuestros resultados muestran que la exposición a insulina durante 15 minutos y al AP durante 6 minutos y una hora incrementaron los niveles de ATP. El incremento mayor de ATP por el AP se observó a los 6 minutos posteriores a su exposición, mismo tiempo en el que observamos el incremento mayor de los niveles de Ca^{2+} por este ácido graso. Además, el aumento de ATP por el AP se mantuvo una hora después del tratamiento, pero en menor proporción.

Para corroborar que el aumento de ATP se debía a la β -oxidación del AP, las células fueron pre-incubadas con etomoxir, un inhibidor de carnitina que transporta a los ácidos grasos a la matriz mitocondrial, evitando así su β -oxidación. En estos experimentos se mostró que el etomoxir impide el incremento del ATP inducido por el AP, apoyando fuertemente que este ATP proviene de la β -oxidación mitocondrial (**Figura 13 A**). Con esta evidencia, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la movilización de Ca^{2+} inducida por el AP era dependiente de la producción de ATP. En la **figura 13 B**, se muestra el diseño experimental así como la línea de temporal de los diferentes tratamientos. Las células fueron expuestas con etomoxir previo al AP y posteriormente se hizo el registro de calcio con microscopía de fluorescencia. En presencia de etomoxir no se observó el incremento de Ca^{2+} citosólico previamente reportado (**Figura 13 C, D**), demostrando que el ATP generado por la β -oxidación del AP regula la entrada de Ca^{2+} .

Para evaluar por cuál mecanismo el ATP regula la entrada de Ca^{2+} , las células se trataron con la enzima apirasa que hidroliza el ATP extracelular lo cual podría impedir la activación de receptores purinérgicos asociados con la entrada de Ca^{2+} (Burnstock, 2007). Aunque en esta condición se observó una reducción significativa en la entrada de Ca^{2+} dependiente del AP, no se bloqueó por completo (**Figura E, F**). Posteriormente, las células se pre-incubaron con diazoxide, el cuál abre los canales de K^+ sensibles a ATP, produciendo hiperpolarización y evitando la apertura de los VCCGs. En esta condición, la movilización de Ca^{2+} inducida por el AP se bloqueó totalmente (**Figura E, F**).

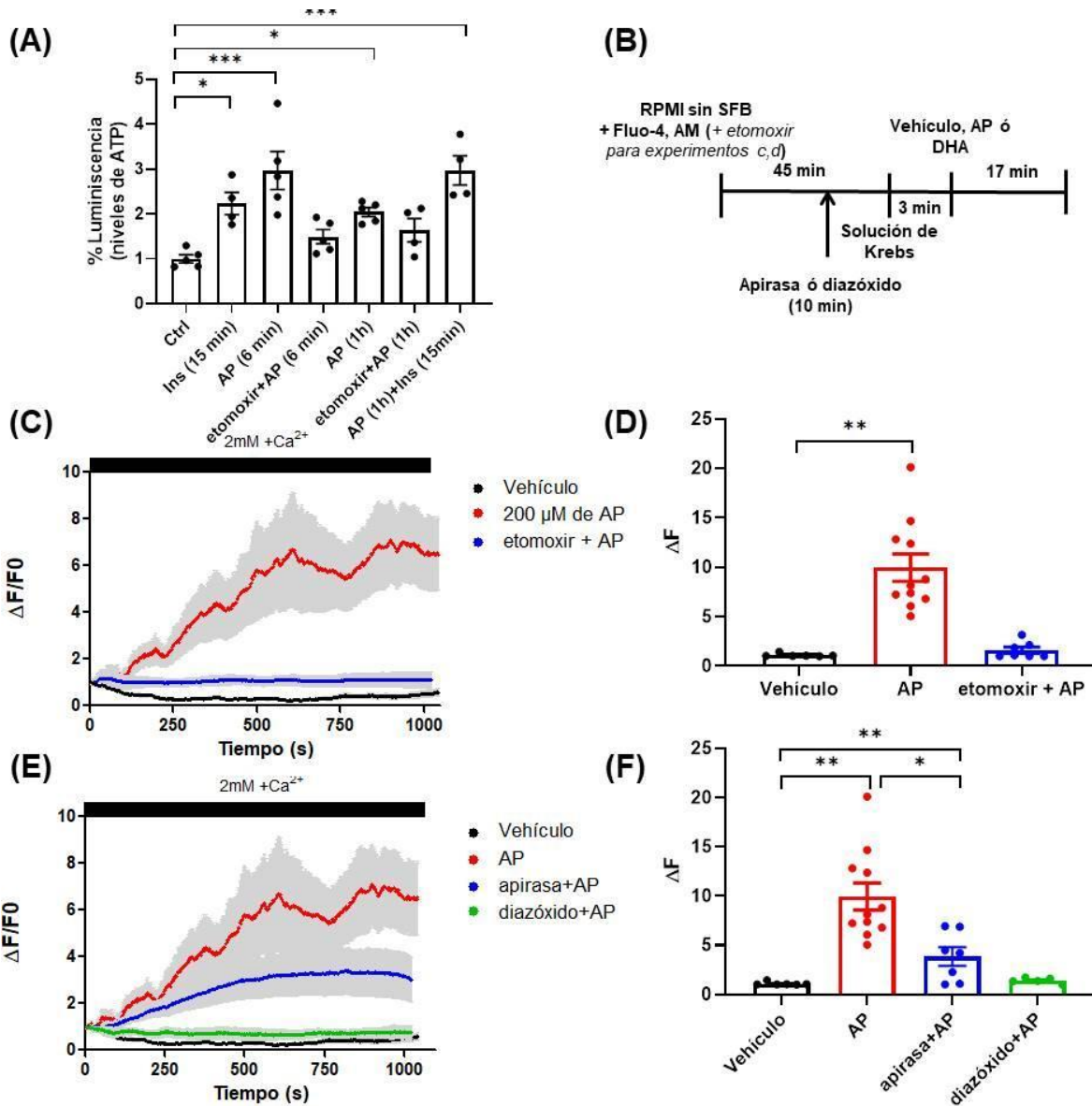


Figura 13. Papel de la β -oxidación en la producción de ATP dependiente del AP y la movilización de Ca^{2+} .

A, Los niveles de ATP se incrementaron después de la exposición de células a insulina, 15 min o AP, 6 minutos (100% y 150% respectivamente). El incremento en ATP permaneció después de 1 hora a la exposición del AP y fue bloqueado por el inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa, etomoxir. Los datos representan el promedio \pm SEM de 4-5 cultivos independientes evaluados por cuatriplicado. **B,** Protocolo experimental. **C,** Cambios en la dinámica de Ca^{2+} inducidos por el AP

fueron también inhibidos por etomoxir y se muestra la cuantificación en **D**. Efecto del activador del canal de K^+ ATP diazóxido y de la enzima apirasa que hidroliza el AP externo, en la movilización de Ca^{2+} por el AP (**E**), y su cuantificación se muestra en **F**. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM de 6-11 cultivos independientes, cada uno con 20 células por condición en triplicado. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía seguida por la prueba post hoc Dunnett * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$; n = 4-5 (a); c: n = 5 (veh), n = 10 (AP), n = 6 (etomoxir + AP); d: n = 6 (veh), n = 11 (AP), n = 7 (apirasa + AP), n = 5 (diazóxido + AP).

8.9 El incremento citosólico de Ca^{2+} inducido por AP se asocia con resistencia a la insulina.

Una vez que observamos la participación del ATP en la movilización de Ca^{2+} dependiente del AP, evaluamos si este Ca^{2+} entrante podría contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina, probablemente al generar la activación de PKCs clásicas que regulan negativamente la vía de señalización de esta hormona. Para comprobar esto, las células se incubaron en solución Ringer-Krebs con y sin Ca^{2+} en presencia y ausencia del AP y se midió la activación de Akt mediada por insulina. Tal como se muestra en la **figura 14 A**, la ausencia del Ca^{2+} extracelular previno el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina, sugiriendo que el mecanismo por el cual el AP induce resistencia a la insulina se asocia con un incremento de Ca^{2+} que pudiera activar PKCs clásicas, tal como lo demostramos con los experimentos con BIM.

Para profundizar en el efecto de activación de PKC mediada por el Ca^{2+} movilizado por el AP, analizamos los cambios en la fosforilación de PKC- α S657, una PKC dependiente de Ca^{2+} y cuya activación ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina en células de tejido periférico (Kellerer et al., 1998; Nawaratne et al., 2006). En la **figura 14 B**

se observa que cuando las células son incubadas con Ca^{2+} extracelular, hay un aumento significativo de la actividad de PKC- α en presencia del AP, sin embargo esta activación ya no se observa cuando las células se incuban en medio sin Ca^{2+} . Nuestros resultados sugieren que el incremento en la entrada de Ca^{2+} dependiente del AP, podría preceder la activación de PKC- α y que a su vez, esta última contribuir a la disminución de la señalización de la insulina, probablemente al fosforilar al RI o IRS-1 en residuos de inhibición (serina), aunque esto último ya no fue evaluado.

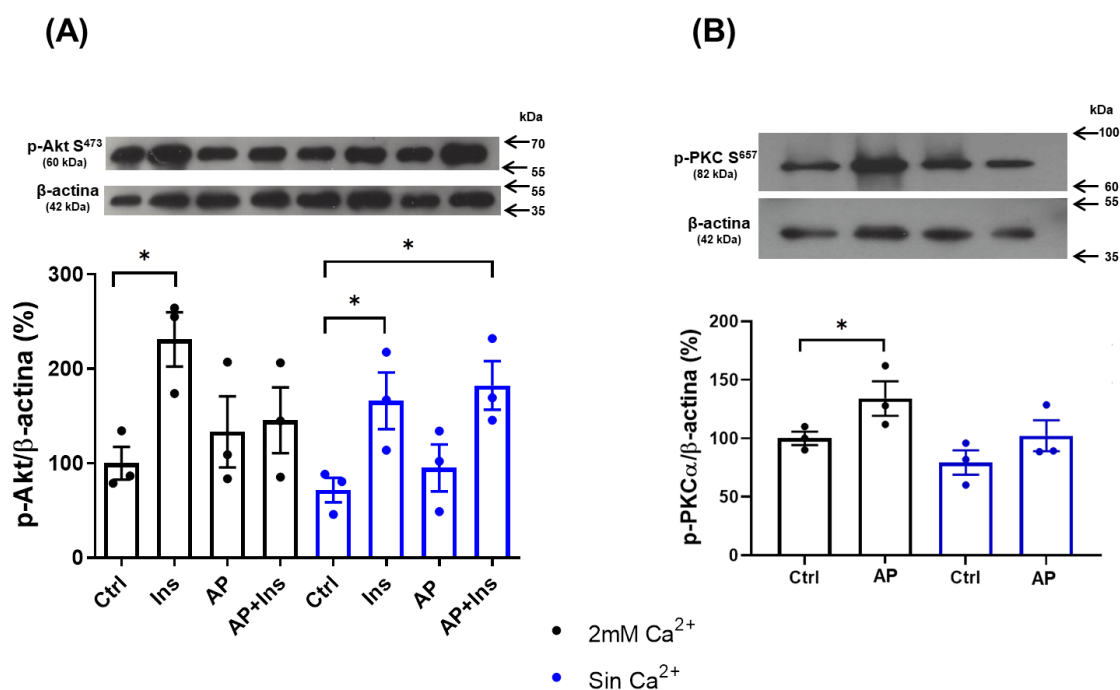


Figura 14. Efecto del Ca^{2+} en la reducción de la señalización de la insulina dependiente del AP y activación de PKC.

A, Western blot representativo y análisis densitométrico de p-Akt S473 de células de neuroblastoma humano diferenciado expuestas a AP (200 μM) durante 1 hora y después de 15 minutos de estimulación con insulina en la presencia y ausencia de Ca^{2+} externo. **B**, Western blot representativo y análisis densitométrico de p-PKC α S657. Porcentaje promedio \pm SEM de 3 cultivos

independientes. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía seguida por la prueba post hoc Dunnett. * $p < .05$; $n = 3$

9. DISCUSIÓN

Aunque el AP es uno de los ácidos grasos saturados más abundantes en las dietas humanas y ha sido implicado en el desarrollo de resistencia a la insulina en tejidos periféricos, su papel en los cambios en la sensibilidad a esta hormona en neuronas aún no ha sido estudiado a profundidad (Bumsup Kwon et al., 2014). El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del AP en la señalización de la insulina neuronal, así como los mecanismos implicados en un modelo de neuroblastoma humano diferenciado a neurona. Se utilizó la exposición al AP por periodos cortos sobre las neuronas a una dosis alta pero que no produce neurotoxicidad (200 μ M) (Calvo-Ochoa et al., 2017; Flores-León et al., 2019) y que es similar a la concentración encontrada en el plasma de sujetos con obesidad y diabetes (Clare et al., 2002; Grapov et al., 2012).

Los resultados de este estudio mostraron que durante una hora de exposición el AP inhibe la vía insulina/PI3K/Akt tanto en células de neuroblastoma humano diferenciado como en neuronas corticales, lo cual fue evaluado midiendo la reducción en la fosforilación del efector de la señalización de la insulina, Akt (**Figura 6 y 7**). También observamos que como resultado de la resistencia a la insulina inducida por AP hay una disminución significativa de la actividad oxido-reductora mitocondrial activada por esta hormona. Sin embargo, este efecto sólo fue observado en tiempos de exposición cortos de una hora y no

a 24 horas, sugiriendo que la metabolización del ácido graso ocurre de manera rápida en tiempos cortos de exposición (**Figura 5**).

Este trabajo también demuestra que la exposición al ácido graso por 1 hora mantiene un incremento de la actividad metabólica de la célula y reduce los niveles de NAD⁺, indicando que el AP puede activar el metabolismo oxidativo neuronal (**Figura 5 C**). Dado que estos cambios metabólicos sólo fueron consecuencia de la exposición a 1 hora del AP y no a 24 horas, los resultados sugieren que el AP puede ser oxidado en la mitocondria y ser utilizado como fuente energética inmediatamente después de su exposición y captura por la neurona, y que posterior a una exposición prolongada ya no se observa la activación metabólica.

Se sabe que altas concentraciones de ácidos grasos saturados afectan procesos como la producción de ATP debido a la fuga de electrones y producción de EROs en la mitocondria. Este fenómeno promueve estrés oxidativo y daño mitocondrial que podría conducir a una situación parecida a la hipoxia y llevar a la apoptosis celular (P Schönfeld & Wojtczak, 2008; Peter Schönfeld & Reiser, 2013). En resultados previos del laboratorio, se demostró que el efecto metabólico de la insulina en la actividad oxido-reductora mitocondrial fue dependiente de la glucosa externa (Calvo-Ochoa, Tesis Doctorado). Por lo tanto, esto podría confirmar que los transportadores de glucosa que dependen de la insulina en el cerebro, GLUT3 y GLUT4, son translocados a la membrana neuronal por la activación de la vía insulina/PI3K/Akt, incrementando la recaptura de glucosa y el metabolismo energético. Además, algunos estudios sugieren que la insulina promueve la actividad glucolítica al activar enzimas como la fosfofructocinasa de manera dependiente de la vía PI3K/Akt (Benomar et al., 2006). Por otro lado, nuestros resultados sugieren que en presencia de altas concentraciones de AP, la actividad mitocondrial es independiente de la

glucosa, apoyando la idea de que las neuronas podrían estar usando también el AP como fuente energética cuando son expuestas a altas concentraciones de ácidos grasos libres con las desventajas metabólicas que de ello resultan (Peter Schönfeld & Reiser, 2013).

Para estudiar los mecanismos que subyacen a los efectos negativos producidos por el AP en la actividad metabólica dependiente de insulina, evaluamos si en presencia del AP se activa la cinasa mTOR, que es considerada un sensor metabólico que al activarse inhibe la vía de señalización de la insulina. Mediante el análisis del estado de fosforilación de mTOR, encontramos que el AP activa a esta enzima de manera similar a lo que hace la insulina y al co-incubar AP e insulina, la activación de mTOR tiende a ser mayor que el control aunque no fue estadísticamente diferente al tratamiento con insulina sola o con AP solo (**Figura 8 A**). Estos resultados confirman que la cinasa mTOR es activada directamente por PI3K/Akt, aunque también se activa por el AP de manera independiente a la insulina. Esto se observa con la activación de la cinasa mTOR a pesar de la desensibilización a la insulina (**Figura 7 y 8**). Además, cuando las células se trataron con rapamicina esta activación de mTOR fue impedida (**Figura 8 B**).

Se sabe que los ácidos grasos también pueden activar a mTOR de manera independiente de Akt mediante la inhibición de la cinasa activada por AMP (AMPK) (B Kwon & Querfurth, 2015; Mordier & Iynedjian, 2007; Wu, Song, Xu, Zhang, & Zou, 2007). De acuerdo a este mecanismo, el incremento en la producción de ATP mediante el metabolismo del AP a través de la β -oxidación mitocondrial reduce la actividad de AMPK y por consiguiente una reducción de la inhibición de mTOR vía AMPK. Los resultados obtenidos en la presente tesis apoyan esta idea al demostrar que el AP incrementa la actividad mitocondrial de manera independiente a la glucosa externa, y reduciendo la relación de NAD^+/NADH .

Referente a esta posibilidad, se ha visto que en neuronas hipotalámicas la resistencia a la insulina producida por el AP es inducida mediante el aumento de su metabolismo en la mitocondria, dado que el metilpalmitato, un sustrato no metabolizable a una hora, no tuvo ningún efecto en la inhibición de la señalización de la insulina. Además, al activar AMPK se impidió el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina (Mayer & Belsham, 2010). Estos resultados sugieren que el AP podría inducir resistencia a la insulina mediante su metabolismo mitocondrial y la activación de la señalización de mTOR vía la inhibición de AMPK. En resultados previos del laboratorio también publicados en el primer artículo de este proyecto, se observó que la actividad mitocondrial dependiente de insulina se impidió cuando las células se trataron previamente con rapamicina (Calvo-Ochoa et al., 2017). Esto puede ser explicado ya que Akt requiere una primera fosforilación por mTOR para poder ser activada por PI3K y con eso aumentar la actividad glucolítica de la célula (Hresko & Mueckler, 2005; Sarbassov, Guertin, Ali, & Sabatini, 2005; Zeng et al., 2007).

Otro efecto importante que se describió en la primera parte de este proyecto fue el papel de las EROs producidas por la actividad mitocondrial como participantes en la pérdida de la sensibilidad a la insulina en presencia del AP. En este sentido, encontramos que el tratamiento con el antioxidante específico mitocondrial, mitoTEMPO, previno el efecto inhibitorio del AP sobre la actividad metabólica y la fosforilación de Akt inducida por insulina (**Figura 9**). Además, observamos que la incubación con mitoTEMPO redujo la fosforilación de Akt en presencia sólo de insulina (**Figura 9 D**), posiblemente asociado con la producción en la mitocondria del pulso transitorio de H₂O₂ que requiere la señalización de la insulina y que parece promover la autofosforilación del receptor de insulina (Goldstein et al., 2005; Mahadev et al., 2001; Persiyantseva et al., 2013; Pomytkin &

Kolesova, 2003; Schmid, El Benna, Galter, Klein, & Dröge, 1998; Storozhevykh, Senilova, Persiyantseva, Pinelis, & Pomytkin, 2007).

Sin embargo, es importante mencionar que un exceso en la producción de EROs mitocondriales podría generar el efecto contrario y disminuir la señalización de la insulina (Anderson et al., 2009; Goldstein et al., 2005). De acuerdo con esto, se ha reportado en otros tejidos que el metabolismo oxidativo del AP aumenta la producción de EROs, incluyendo al H_2O_2 (Anderson et al., 2009; Bonnard et al., 2008; Koves et al., 2008). Además, se sabe que un incremento agudo y/o sostenido en la producción de H_2O_2 sobrepasa la capacidad antioxidante de la mitocondria lo cual produce una fuga de electrones y desacoplamiento mitocondrial de manera temporal (Anderson et al., 2009; Evans, Maddux, & Goldfine, 2005; Korshunov, Skulachev, & Starkov, 1997; S. Liu, 1999; Moser, Matsuzaki, & Humphries, 2009; Tretter & Adam-Vizi, 2000). En el presente modelo, la reducción de MTT utilizada para medir la activación mitocondrial ocurre principalmente en el complejo II, mediante la succinato deshidrogenasa, la cual es la misma enzima responsable de la generación del pulso de H_2O_2 después de la estimulación con insulina (Musser & Oseroff, 1994; Slater, Sawyer, & Straeuli, 1963; Takahashi, Abe, Gotoh, & Fukuuchi, 2002), esto explicaría el incremento en la reducción de MTT por insulina y su impedimento probablemente por la sobreproducción temporal de H_2O_2 debido a la incubación con AP e insulina.

En conclusión, los mecanismos que reportamos y que están involucrados en los efectos del AP sobre la actividad metabólica y la disminución de la señalización por insulina incluyen: 1) activación del metabolismo mitocondrial lo cual produce un incremento en la producción de EROs mitocondriales, incluyendo H_2O_2 , y activación de mTOR vía inhibición de AMPK

por ATP. 2) generación de un estado pro-oxidante en el que el AP podría estar incrementando la amplitud y duración del pulso de H₂O₂ dependiente de insulina. Este incremento en EROs podría tener dos consecuencias: primero, disminuir la señalización de la insulina probablemente al impedir la autofosforilación del receptor de insulina, ocasionando la disminución de la actividad glucolítica; segundo, al tratar a las células con AP e insulina se podría aumentar la actividad de la succinato deshidrogenasa disminuyendo el metabolismo mitocondrial de manera temporal (**Figura 15**).

Como segunda parte del proyecto demostramos que en la neurona el AP puede metabolizarse en la mitocondria, y a través de la β -oxidación incrementar los niveles de ATP, favorecer la entrada de Ca²⁺ que probablemente esté activando PCK α . Se sabe que los ácidos grasos pueden cruzar la barrera hematoencefálica (Dhopeshwarkar & Mead, 1973) y que existen niveles elevados de AP en el líquido cefalorraquídeo de personas obesas en comparación con personas sanas (Melo et al., 2020; Pilitsis et al., 2001) sugiriendo que las neuronas pueden ser expuestas a altas concentraciones de AP bajo condiciones de obesidad. Sin embargo, esta es la primera evidencia sobre el papel de la β -oxidación del AP en las neuronas que es capaz de inducir un aumento significativo en los niveles de ATP asociado con la movilización de Ca²⁺ externo.

A excepción de los astrocitos (Panov, Orynbayeva, Vavilin, & Lyakhovich, 2014) y de las neuronas hipotalámicas (Lam, Schwartz, & Rossetti, 2005; McFadden et al., 2014), por mucho tiempo ha sido aceptado que los ácidos grasos no son β -oxidados por las neuronas, ya que no cuentan con una maquinaria activa para llevar a cabo este proceso en la mitocondria (Peter Schönfeld & Reiser, 2013). Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que el ATP producido por la metabolización del AP en las neuronas diferenciadas

del neuroblastoma humano MSN, fue totalmente bloqueado en presencia de etomoxir (**Figura 13 A**), el inhibidor específico de carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), que impide que los ácidos grasos activados sean transportados hacia la matriz mitocondrial para su metabolismo energético. Estos resultados junto con la reducción del índice NAD/NADH y el incremento en la reducción de MTT indican que el AP en altas concentraciones (200 μM o mayor en cultivo celular) es capaz de estimular el metabolismo oxidativo en neuronas, como puede ocurrir en sujetos diabéticos u obesos (Clare et al., 2002), generando la pérdida de sensibilidad a la insulina y de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} .

Dado que el GPR40, también conocido como el receptor a ácidos grasos 1, está altamente expresado en el cerebro, evaluamos su posible papel en el efecto inhibitorio del AP sobre la señalización de la insulina mediante la movilización de Ca^{2+} . Se sabe que GPR40 señala predominantemente a través de las proteínas G heterotriméricas Gq/11, y que por la acción de la fosfolipasa C se produce diacilglicerol y liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, ambos implicados en la activación de PKCs. Por un lado las PKCs clásicas requieren de Ca^{2+} , mientras que las PKCs nuevas de diacilglicerol. Sorprendentemente, nuestros resultados mostraron que el Ca^{2+} movilizado por el AP fue totalmente dependiente del Ca^{2+} externo (**Figura 11 y 12**), por lo tanto, en este modelo excluimos el papel de la activación de GPR40 después de la exposición al AP. A diferencia del DHA, el otro ligando bien descrito de GPR40, que tal como se esperaba incrementó los niveles de Ca^{2+} interno de una manera independiente al Ca^{2+} externo y bloqueado con el uso del antagonista de GPR40, GW1100 (**Figura 11 y 12**).

En otros trabajos ya había sido descrito en una línea de células β -pancreáticas, que el AP es capaz de incrementar los niveles de Ca^{2+} interno dependiente del Ca^{2+} extracelular y que

este incremento se bloqueaba al inhibir los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje o por la apertura de los canales de K^+ dependientes de ATP (Shapiro et al., 2005). En estas mismas células, se observó que la apoptosis inducida por el AP fue prevenida por el quelante de Ca^{2+} EGTA, lo mismo que al bloquear los canales de Ca^{2+} del tipo L (Choi et al., 2007). Previamente había sido reportado que en células de neuroblastoma, el GPR40 se activa por DHA pero no por el AP (Zamarbide et al., 2014), igual a lo que encontramos en este trabajo.

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual el AP incrementa los niveles de Ca^{2+} en la célula, hay dos mecanismos propuestos y que fueron evaluados en esta tesis. Ambos mecanismos implican un incremento en la producción de ATP. Uno de los mecanismos parece estar asociado con el cierre de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), lo cual induce la despolarización de la neurona y por consiguiente la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, tal como ha sido observado en neuronas hipotalámicas, como un mecanismo implicado en la regulación de los niveles de glucosa sistémica (Kishore et al., 2011) y en células β -pancreáticas para la secreción de insulina dependiente de glucosa (Huopio et al., 2002).

En el presente trabajo, se demostró que en presencia de etomoxir, el cual impide la producción de ATP al inhibir la β -oxidación del AP, la movilización de Ca^{2+} fue impedida por completo (**Figura 13 C y D**). Además, cuando las células fueron co-incubadas con AP y diazóxido, un activador de los canales de K_{ATP} , se bloqueó la entrada de Ca^{2+} (**Figura 13 E y F**). Sin embargo, otro mecanismo descrito para la movilización de Ca^{2+} dependiente de ATP ha sido asociado con la liberación extracelular de ATP el cual puede activar a los canales purinérgicos de tipo P2X, estimulando la entrada de Ca^{2+} (North, 2002). Para

probar este mecanismo se utilizó la enzima apirasa para hidrolizar el ATP externo e impedir la activación de los receptores P2X. Aunque se observó una pequeña pero significativa reducción del incremento de Ca^{2+} en presencia de apirasa, el efecto inhibitorio sobre la elevación de Ca^{2+} fue mayor cuando se activaron los canales de K_{ATP} por el uso de diazoxide (**Figura 13 E y F**). Esto sugiere que la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje por la despolarización neuronal es más prominente, aunque también puede existir la participación de los canales purinérgicos activados por la liberación de ATP a través de vesículas. Esta pequeña fracción de receptores P2X activados por ATP, pudiera contribuir a la generación también de DAG contribuyendo así a la activación observada de PKCalfa.

La evidencia aportada sugiere que el metabolismo energético del AP está implicado en el desarrollo de resistencia a la insulina a través de la movilización de Ca^{2+} dependiente de ATP y que uno de los efectores podrá ser la activación de mTOR y PKCs, ya que al inhibir a estas cinasas mediante el uso de rapamicina o BIM se impidió la pérdida de sensibilidad a la insulina inducida por el AP. Dado que las PKCs clásicas son activadas por un incremento en Ca^{2+} (Lipp & Reither, 2011), es factible suponer que el aumento de Ca^{2+} mediado por el AP resulte en la activación de PKCs clásicas, y que éstas modulan negativamente la vía de insulina/PI3K/Akt a través de la fosforilación de IRS-1 o RI (M. Liu et al., 2017; Sampson & Cooper, 2006), ya que BIM revirtió el efecto negativo del AP sobre la vía de la insulina y dado que el AP regula la activación de PKCs de una manera dependiente al Ca^{2+} , tal como nuestros resultados lo mostraron. Dado que BIM es un inhibidor general de las PKCs, es posible suponer que en el efecto del AP sobre la vía de la insulina, puedan estar implicadas diferentes isoformas de PKCs. Por ejemplo en otros estudios realizados en células de músculo esquelético, adipocitos y neuronas

hipotálamicas, se ha visto la participación de PKC zeta, épsilon y teta en el desarrollo de resistencia a la insulina (Benoit et al., 2009; Miura et al., 2003; Powell et al., 2004; Sokolowska & Blachnio-Zabielska, 2019). Por lo tanto, no sería extraño que el AP activara diferentes isoformas de PKCs por varios mecanismos, ya sea a través de mTOR, de la producción de ceramidas o dependientes del ATP generado por su β -oxidación. En este trabajo, exploramos este último posible mecanismo de activación de PKC dependientes del ATP. Dado que las PKCs clásicas requieren de Ca^{2+} y DAG para su activación, decidimos evaluar la participación de PKCalfa en la desensibilización a la insulina, dado que ya se ha reportado en células de tejido periférico su implicación (Kellerer et al., 1998; Nawaratne et al., 2006). En efecto observamos que esta PKC podría tener un papel importante en la resistencia a la insulina, posiblemente activada por el Ca^{2+} movilizado por el ATP generado a partir de la β -oxidación del AP y el DAG producido ya sea a partir del AP, por la misma activación de la vía de la insulina, ya que se sabe que la fosfolipasa C se une y activa al RI fosforilado, produciendo IP3 y DAG o por la activación de una pequeña fracción de receptores P2X (Murillo-Maldonado, Zeineddine, Stock, Thackeray, & Riesgo-Escovar, 2011).

También encontramos que la inhibición de mTOR con rapamicina impidió el efecto del AP sobre la señalización de la insulina. mTOR es el principal regulador de la respuesta metabólica de la célula y modula negativamente la vía insulina/PI3K/Akt (Ardestani & Maedler, 2018). Dado que la activación de mTORC1 es influenciada por los niveles intracelulares de ATP (Dennis et al. 2001), el incremento en los niveles de ATP después de la exposición neuronal al AP podría activar mTORC1 y por lo tanto participar en la inhibición de la vía de la insulina, tal como sugieren nuestros resultados.

Estos resultados en conjunto, nos permiten proponer otro nuevo mecanismo para el efecto del AP, en el cual, este ácido graso saturado incrementa los niveles de ATP, produce dishomeostasis de Ca^{2+} e impide la señalización de la insulina (**Figura 15**). Interesantemente, la pérdida de homeostasis de Ca^{2+} ha sido fuertemente asociado con enfermedades cerebrales en el envejecimiento (Kumar, Bodhinathan, and Foster 2009) lo cual puede ser una de las principales consecuencias graves del consumo excesivo y crónico de ácidos grasos saturados.

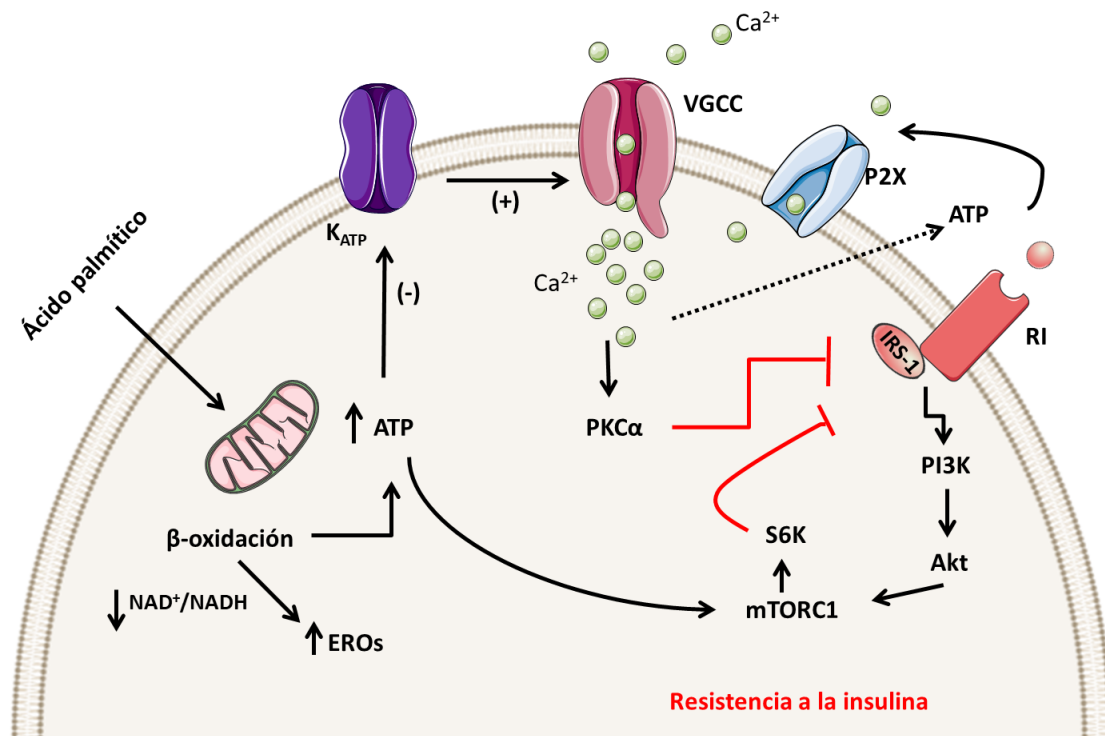


Figura 15. Mecanismos propuestos de resistencia a la insulina inducida por el AP.

Incremento de EROs y ATP por la β -oxidación del AP. El ATP generado activa a mTORC1 el cual contribuye a la inhibición de la señalización de la insulina; también cierra canales de K dependientes de ATP y activa receptores purinérgicos dirigiendo al

incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, activación de $\text{PKC}\alpha$ y reducción de la sensibilidad a la insulina.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que en neuronas el AP disminuye la señalización de la insulina mediante un mecanismo que implica la β -oxidación del ácido graso. También mostramos que el metabolismo del AP incrementa la producción de EROs que contribuyen a la inhibición de la señalización insulina/PI3K/Akt. Como segundo mecanismo participante en los efectos nocivos del AP sobre la señalización de la insulina, demostramos que los niveles incrementados de ATP por su β -oxidación, se asocia con incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico que junto con la activación de mTOR/S6K/ dependiente del mismo ATP, podrían activar a PKCs clásicas y regular negativamente la señalización de la insulina. Este trabajo es la primera evidencia de que el AP puede ser metabolizado por las neuronas y muestra un nuevo mecanismo sobre el desarrollo de resistencia a la insulina por el AP en estas células. Por otra parte, este trabajo abre nuevas interrogantes como ¿cuáles son los mecanismos de regulación de Ca^{2+} en las neuronas? y ¿Cómo se afectan ante el consumo de dietas altas en grasa? ¿Cuál es la participación de las ceramidas? ¿Qué otras PKCs participan en los efectos deletéreos del AP en la neurona?

11. REFERENCIAS

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, *37*(1), 13–25.

<http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>

Agostini, M., Romeo, F., Inoue, S., Niklison-Chirou, M. V, Elia, A. J., Dinsdale, D., ... Melino, G.

(2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death &*

Differentiation, *23*(9), 1502–1514. <http://doi.org/10.1038/cdd.2016.36>

Alnahdi, A., John, A., & Raza, H. (2019). Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells by palmitic acid. *Nutrients*, *11*(9).

<http://doi.org/10.3390/NU11091979>

Amine, H., Benomar, Y., & Taouis, M. (2021). Palmitic acid promotes resistin-induced insulin

resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma. *Scientific Reports*, *11*(1),

5427. <http://doi.org/10.1038/S41598-021-85018-7>

Amorim, R., Simões, I., Veloso, C., Carvalho, A., Simões, R., Pereira, F., ... Oliveira, P. (2021).

Exploratory Data Analysis of Cell and Mitochondrial High-Fat, High-Sugar Toxicity on Human

HepG2 Cells. *Nutrients*, *13*(5). <http://doi.org/10.3390/NU13051723>

Amruthesh, S. C., Boerschel, M. F., McKinney, J. S., Willoughby, K. A., & Ellis, E. F. (1993).

Metabolism of Arachidonic Acid to Epoxyeicosatrienoic Acids, Hydroxyeicosatetraenoic Acids, and Prostaglandins in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*,

61(1), 150–159. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03550.x>

- Anderson, E. J., Lustig, M. E., Boyle, K. E., Woodlief, T. L., Kane, D. A., Lin, C.-T., ... Neuffer, P. D. (2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(3), 573–81. <http://doi.org/10.1172/JCI37048>
- Arai, H. (1996). Biological Markers for the Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 65–79. <http://doi.org/10.1620/tjem.179.65>
- Ardestani, A., & Maedler, K. (2018). mTORC1 and IRS1: Another Deadly Kiss. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *29*(11), 737–739. <http://doi.org/10.1016/J.TEM.2018.07.003>
- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., ... Kim, S. F. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of Disease*, *67*, 79–87. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.011>
- Auestad, N., Korsak, R. A., Morrow, J. W., & Edmond, J. (1991). Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*, *56*(4), 1376–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002348>
- Austin, G. L., Ogden, L. G., & Hill, J. O. (2011). Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971–2006. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *93*(4), 836–843. <http://doi.org/10.3945/ajcn.110.000141>
- Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, *136*(1), 82–93.

<http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>

Barquera, S., & Rivera, J. A. (2020). Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *8*(9), 746–747.

[http://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30269-2](http://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30269-2)

Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., ... Clegg, D. J.

(2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(9), 2577–89.

<http://doi.org/10.1172/JCI36714>

Benomar, Y., Naour, N., Aubourg, A., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., ... Taouis, M. (2006). Insulin

and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology*,

147(5), 2550–6. <http://doi.org/10.1210/EN.2005-1464>

Besse-Patin, A., & Estall, J. L. (2014). An intimate relationship between ROS and insulin signalling:

Implications for antioxidant treatment of fatty liver disease. *International Journal of Cell*

Biology, *2014*, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2014/519153>

Biessels, G. J., & Reagan, L. P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction.

Nature Reviews. Neuroscience, *16*(11), 660–71. <http://doi.org/10.1038/nrn4019>

Blázquez, E., & Quijada, C. L. (1968). The effect of a high-fat diet on glucose, insulin sensitivity and

plasma insulin in rats. *Journal of Endocrinology*, *42*(4), 489–494.

<http://doi.org/10.1677/joe.0.0420489>

Boden, G. (1999). Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proceedings of*

the Association of American Physicians, 111(3), 241–8. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354364>

Bond, L. M., Miyazaki, M., O'Neill, L. M., Ding, F., & Ntambi, J. M. (2016). Fatty acid desaturation and elongation in mammals. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (pp. 185–208).

Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaume, E., Chauvin, M., Morio, B., ... Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2).

<http://doi.org/10.1172/JCI32601>

Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., ... Muir, A. I. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11303–11311.

<http://doi.org/10.1074/jbc.M211495200>

Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(12), 1471–83. <http://doi.org/10.1007/S00018-007-6497-0>

Busquets, O., Ettcheto, M., Pallàs, M., Beas-Zarate, C., Verdaguer, E., Auladell, C., ... Camins, A. (2017). Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of β -amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice. A potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 162, 38–45.

<http://doi.org/10.1016/j.mad.2016.11.002>

Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., & Arias, C. (2014). Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite

and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(6), 1001–8. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>

Calvo-Ochoa, E., Sánchez-Alegría, K., Gómez-Inclán, C., Ferrera, P., & Arias, C. (2017). Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochemistry International*, 110, 75–83. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>

Campana, M., Bellini, L., Rouch, C., Rachdi, L., Coant, N., Butin, N., ... Le Stunff, H. (2018). Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β -cell function of obese Zucker rats. *Molecular Metabolism*, 8, 23–36. <http://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.10.013>

Carpentieri, A., Cozzoli, E., Scimeca, M., Bonanno, E., Sardanelli, A. M., & Gambacurta, A. (2015). Differentiation of human neuroblastoma cells toward the osteogenic lineage by mTOR inhibitor. *Cell Death & Disease*, 6(11), e1974. <http://doi.org/10.1038/cddis.2015.244>

Carta, G., Murru, E., Banni, S., & Manca, C. (2017). Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiology*, 8. <http://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00902>

Carta, G., Murru, E., Lisai, S., Sirigu, A., Piras, A., Collu, M., ... Banni, S. (2015). Dietary Triacylglycerols with Palmitic Acid in the sn-2 Position Modulate Levels of N-Acylethanolamides in Rat Tissues. *PLOS ONE*, 10(3), e0120424. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0120424>

Chatterjee, S., Ambegaokar, S. S., Jackson, G. R., & Mudher, A. (2019). Insulin-mediated changes in tau hyperphosphorylation and autophagy in a drosophila model of tauopathy and

neuroblastoma cells. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 801.

<http://doi.org/10.3389/fnins.2019.00801>

Chavez, J. A., & Summers, S. A. (2012). A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 15(5), 585–594. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.002>

Chen, B., Huang, Y., Zheng, D., Ni, R., & Bernards, M. (2018). Dietary Fatty Acids Alter Lipid Profiles and Induce Myocardial Dysfunction without Causing Metabolic Disorders in Mice. *Nutrients*, 10(1), 106. <http://doi.org/10.3390/nu10010106>

Cheng, C. M., Mervis, R. F., Niu, S.-L., Salem, N., Witters, L. A., Tseng, V., ... Bondy, C. A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *Journal of Neuroscience Research*, 73(1), 1–9. <http://doi.org/10.1002/jnr.10634>

Chiu, S., & Cline, H. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*, 5(7). <http://doi.org/10.1186/1749-8104-5-7>

Cho, Y., Basu, A., Dai, A., Heldak, M., & Makino, A. (2013). Coronary endothelial dysfunction and mitochondrial reactive oxygen species in type 2 diabetic mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(10). <http://doi.org/10.1152/AJPCELL.00234.2013>

Choi, S.-E., Kim, H.-E., Shin, H.-C., Jang, H.-J., Lee, K.-W., Kim, Y., ... Kang, Y. (2007). Involvement of Ca²⁺-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 272(1–2), 50–62. <http://doi.org/10.1016/J.MCE.2007.04.004>

Christie, J., Wenthold, R., & Monaghan, D. (1999). Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1523–8. <http://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.721523.X>

- Chudoba, C., Wardelmann, K., & Kleinridders, A. (2019). Molecular effects of dietary fatty acids on brain insulin action and mitochondrial function. *Biological Chemistry*, *400*(8), 991–1003.
<http://doi.org/10.1515/hsz-2018-0477>
- Clegg, D. J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M. D., Benoit, S. C., Brown, L. M., ... Woods, S. C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiology & Behavior*, *103*(1), 10–16.
<http://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.01.010>
- Clore, J. N., Allred, J., White, D., Li, J., & Stillman, J. (2002). The role of plasma fatty acid composition in endogenous glucose production in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, *51*(11), 1471–1477. <http://doi.org/10.1053/meta.2002.35202>
- Czech, M. P. (2020). Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. *Molecular Metabolism*, *34*, 27–42. <http://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.014>
- Czech, M. P., Klarlund, J. K., Yagaloff, K. A., Bradford, A. P., & Lewis, R. E. (1988). Insulin receptor signaling. Activation of multiple serine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(23), 11017–11020. [http://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37908-0](http://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37908-0)
- Davies, P. (1983). The neurochemistry of Alzheimer's disease and senile dementia. *Medicinal Research Reviews*, *3*(3), 221–36. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6136637>
- de la Monte, S. M. (2012). Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*, *72*(1), 49–66.
<http://doi.org/10.2165/11597760-000000000-00000>

De Meyts, P. (2000). *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. Endotext.

MDText.com, Inc. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>

Denhez, B., Rousseau, M., Spino, C., Dancosst, D.-A., Dumas, M.-È., Guay, A., ... Geraldes, P. (2020).

Saturated fatty acids induce insulin resistance in podocytes through inhibition of IRS1 via activation of both IKK β and mTORC1. *Scientific Reports*, *10*(1), 21628.

<http://doi.org/10.1038/s41598-020-78376-1>

Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., & Thomas, G. (2001). Mammalian

TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5544), 1102–5.

<http://doi.org/10.1126/science.1063518>

Dhopeshwarkar, G., & Mead, J. (1973). Uptake and transport of fatty acids into the brain and the

role of the blood-brain barrier system. *Advances in Lipid Research*, *11*(0), 109–42.

<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-024911-4.50010-6>

Diaz, B., Fuentes-Mera, L., Tovar, A., Montiel, T., Massieu, L., Martínez-Rodríguez, H. G., &

Camacho, A. (2015). Saturated lipids decrease mitofusin 2 leading to endoplasmic reticulum stress activation and insulin resistance in hypothalamic cells. *Brain Research*, *1627*, 80–89.

<http://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.014>

Dziedzic, B., Szemraj, J., Bartkowiak, J., & Walczewska, A. (2007). Various Dietary Fats Differentially

Change the Gene Expression of Neuropeptides Involved in Body Weight Regulation in Rats.

Journal of Neuroendocrinology, *19*(5), 364–373. <http://doi.org/10.1111/j.1365->

2826.2007.01541.x

Ebert, D., Haller, R. G., & Walton, M. E. (2003). Energy contribution of octanoate to intact rat brain

metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of*

Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience, 23(13), 5928–35.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843297>

Edmond, J. (2001). Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *Journal of Molecular Neuroscience*, 16(2–3), 181–194. <http://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:181>

Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., & de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, 18(4), 551–561. <http://doi.org/10.1002/jnr.490180407>

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., ... Comella, J. X. (2002). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991–1003. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>

Evans, J. L., Maddux, B. A., & Goldfine, I. D. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(7–8), 1040–52. <http://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1040>

Ferrera, P., & Arias, C. (2005). Differential effects of COX inhibitors against beta-amyloid-induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*, 47(8), 589–596. <http://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2005.06.012>

Flores-León, M., Pérez-Domínguez, M., González-Barrios, R., & Arias, C. (2019). Palmitic acid-induced NAD⁺ depletion is associated with the reduced function of SIRT1 and increased

expression of BACE1 in hippocampal neurons. *Neurochemical Research*, 44(7), 1745–1754.

<http://doi.org/10.1007/s11064-019-02810-8>

Gabbouj, S., Ryhänen, S., Marttinen, M., Wittrahm, R., Takalo, M., Kemppainen, S., ... Natunen, T. (2019). Altered insulin signaling in Alzheimer's Disease brain – special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 629. <http://doi.org/10.3389/fnins.2019.00629>

Gao, D., Nong, S., Huang, X., Lu, Y., Zhao, H., Lin, Y., ... Li, J. (2010). The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 29965–73. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.128694>

García-Ruiz, I., Solís-Muñoz, P., Fernández-Moreira, D., Muñoz-Yagüe, T., & Solís-Herruzo, J. A. (2015). In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms*, 8(2), 183–91. <http://doi.org/10.1242/dmm.018234>

Gasparini, L., Gouras, G. K., Wang, R., Gross, R. S., Beal, M. F., Greengard, P., & Xu, H. (2001). Stimulation of β -Amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal β -Amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Neuroscience*, 21(8), 2561–2570. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02561.2001>

Gault, C., Obeid, L., & Hannun, Y. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1–23. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1

Gilani, A., Pandey, V., Garcia, V., Agostinucci, K., Singh, S., Schragenheim, J., ... Laniado Schwartzman, M. (2018). High-fat diet-induced obesity and insulin resistance in CYP4a14 $-/-$

- mice is mediated by 20-HETE. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315(5). <http://doi.org/10.1152/AJPREGU.00125.2018>
- Gimeno, R. E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Current Opinion in Lipidology*, 18(3), 271–6. <http://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3281338558>
- Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 367–417. <http://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009>
- Goalstone, M. L., & Draznin, B. (1997). Insulin signaling. *The Western Journal of Medicine*, 167(3), 166–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9308409>
- Goldstein, B. J., Mahadev, K., Kalyankar, M., & Wu, X. (2005). Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes*, 54(2), 311–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1464057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gomez-Larrauri, A., Das Adhikari, U., Aramburu-Nuñez, M., Custodia, A., & Ouro, A. (2021). Ceramide Metabolism Enzymes-Therapeutic Targets against Cancer. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(7), 729. <http://doi.org/10.3390/medicina57070729>
- Gonçalves, R. A., Wijesekara, N., Fraser, P. E., & Felice, F. G. De. (2019). The link between tau and insulin signaling: Implications for Alzheimer’s Disease and other tauopathies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(17). <http://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00017>
- Gottfries, C. G. (1985). Alzheimer’s disease and senile dementia: Biochemical characteristics and

aspects of treatment. *Psychopharmacology*, 86(3), 245–252.

<http://doi.org/10.1007/BF00432208>

Grant, W. B. (1999). Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 1(4–5), 197–201. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214118>

Grapov, D., Adams, S. H., Pedersen, T. L., Garvey, W. T., & Newman, J. W. (2012). Type 2 diabetes associated changes in the plasma non-esterified fatty acids, oxylipins and endocannabinoids.

PLoS One, 7(11), e48852. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048852>

Greenwald, J., & Riek, R. (2010). Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*

(London, England : 1993), 18(10). <http://doi.org/10.1016/J.STR.2010.08.009>

Growdon, J. H. (1999). Biomarkers of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 56(3), 281.

<http://doi.org/10.1001/archneur.56.3.281>

Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *The Journal of Endocrinology*, 220(2), T1–T23.

<http://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>

Hallschmid, M. (2021). Intranasal insulin for Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 35(1), 21–37.

<http://doi.org/10.1007/s40263-020-00781-x>

Hamilton, J. A. (1999). Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism.

Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids, 60(5–6), 291–7. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471111>

Hara, T., Hirasawa, A., Ichimura, A., Kimura, I., & Tsujimoto, G. (2011). Free Fatty Acid Receptors

FFAR1 and GPR120 as Novel Therapeutic Targets for Metabolic Disorders. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(9), 3594–3601. <http://doi.org/10.1002/jps.22639>

Hara, T., Kimura, I., Inoue, D., Ichimura, A., & Hirasawa, A. (2013). Free Fatty Acid Receptors and Their Role in Regulation of Energy Metabolism. In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (Vol. 164, pp. 77–116). http://doi.org/10.1007/112_2013_13

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–6. <http://doi.org/10.1126/science.1072994>

Hernández-Cáceres, M. P., Toledo-Valenzuela, L., Díaz-Castro, F., Ávalos, Y., Burgos, P., Narro, C., ... Morselli, E. (2019). Palmitic acid reduces the autophagic flux and insulin sensitivity through the activation of the free fatty acid receptor 1 (FFAR1) in the hypothalamic neuronal cell line N43/5. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <http://doi.org/10.3389/fendo.2019.00176>

Hirabara, S. M., Curi, R., & Maechler, P. (2010). Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1), 187–94. <http://doi.org/10.1002/jcp.21936>

Hirasawa, A., Hara, T., Katsuma, S., Adachi, T., & Tsujimoto, G. (2008). Free Fatty Acid Receptors and Drug Discovery. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(10), 1847–1851. <http://doi.org/10.1248/bpb.31.1847>

Hoehn, K. L., Salmon, A. B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A. J., Maghzal, G. J., ... James, D. E. (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17787–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.0902380106>

- Holland, W. L., & Summers, S. A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine Reviews*, 29(4), 381–402. <http://doi.org/10.1210/er.2007-0025>
- Hresko, R. C., & Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40406–16. <http://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>
- Hua, W., Huang, H., Tan, L., Wan, J., Gui, H., Zhao, L., ... Du, X. (2015). CD36 mediated fatty acid-induced podocyte apoptosis via oxidative stress. *PloS One*, 10(5), e0127507. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0127507>
- Huopio, H., Shyng, S.-L., Otonkoski, T., & Nichols, C. G. (2002). K ATP channels and insulin secretion disorders. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(2), E207–E216. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00047.2002>
- Ichimura, A., Hirasawa, A., Hara, T., & Tsujimoto, G. (2009). Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3–4), 82–88. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.05.003>
- Imamura, T., Yanagihara, Y., Ohyagi, Y., Nakamura, N., Iinuma, K., Yamasaki, R., ... Ji, K. (2020). Insulin deficiency promotes formation of toxic amyloid- β 42 conformer co-aggregating with hyper-phosphorylated tau oligomer in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Disease*, 137, 104739. <http://doi.org/10.1016/J.NBD.2020.104739>
- Innis, S. M. (2016). Palmitic Acid in Early Human Development. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 1952–1959. <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1018045>

- Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2018). Palmitic acid induces ceramide accumulation, mitochondrial protein hyperacetylation, and mitochondrial dysfunction in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, *98*(5). <http://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY023>
- Itoh, Y., & Hinuma, S. (2005). GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic β cells, regulates insulin secretion. *Hepatology Research*, *33*(2), 171–3. <http://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.09.028>
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., ... Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*, *422*(6928), 173–176. <http://doi.org/10.1038/nature01478>
- Jo, Y.-H., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., Chua, S., & Jr. (2009). Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology*, *101*(5), 2305–16. <http://doi.org/10.1152/jn.91294.2008>
- Julien, C., Tremblay, C., Phivilay, A., Berthiaume, L., Emond, V., Julien, P., & Calon, F. (2010). High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiology of Aging*, *31*(9), 1516–31. <http://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2008.08.022>
- Kadowaki, T., Tobe, K., Honda-Yamamoto, R., Tamemoto, H., Kaburagi, Y., Momomura, K., ... Yazaki, Y. (1996). Signal transduction mechanism of insulin and insulin-like growth factor-1. *Endocrine Journal*, *43 Suppl*, S33-41. http://doi.org/10.1507/endocrj.43.suppl_s33
- Kamp, F., & Hamilton, J. A. (2006). How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *75*(3), 149–159. <http://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.003>

- Kar, S., Chabot, J., & Quirion, R. (1993). Quantitative autoradiographic localization of [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II, and [125I]insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 333(3).
<http://doi.org/10.1002/CNE.903330306>
- Kellerer, M., Mushack, J., Seffer, E., Mischak, H., Ullrich, A., & Häring, H. (1998). Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia*, 41(7), 833–8. <http://doi.org/10.1007/S001250050995>
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C.-S., Reynolds, K., & He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*, 32(9), 1431–1437.
<http://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>
- Kim, J. Y., Lee, H. J., Lee, S.-J., Jung, Y. H., Yoo, D. Y., Hwang, I. K., ... Han, H. J. (2017). Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid- β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 α and Akt/NF- κ B pathways. *Scientific Reports*, 7(1), 4335. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-04175-w>
- Kim, Y. C., & Guan, K.-L. (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 25–32. <http://doi.org/10.1172/JCI73939>
- Kishore, P., Boucai, L., Zhang, K., Li, W., Koppaka, S., Kehlenbrink, S., ... Hawkins, M. (2011). Activation of KATP channels suppresses glucose production in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4916. <http://doi.org/10.1172/JCI58035>
- Kolesnick, R. (1992). Ceramide: a novel second messenger. *Trends in Cell Biology*, 2(8), 232–236.
[http://doi.org/10.1016/0962-8924\(92\)90310-J](http://doi.org/10.1016/0962-8924(92)90310-J)

- Kong, S. H., Park, Y. J., Lee, J.-Y., Cho, N. H., & Moon, M. K. (2018). Insulin resistance is associated with cognitive decline among older Koreans with normal baseline cognitive function: A prospective community-based cohort study. *Scientific Reports*, *8*(1), 650.
<http://doi.org/10.1038/s41598-017-18998-0>
- Korshunov, S., Skulachev, V., & Starkov, A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters*, *416*(1).
[http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9)
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., ... Muoio, D. M. (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metabolism*, *7*(1), 45–56.
<http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>
- Kurz, J., Parnham, M. J., Geisslinger, G., & Schiffmann, S. (2019). Ceramides as Novel Disease Biomarkers. *Trends in Molecular Medicine*, *25*(1), 20–32.
<http://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.10.009>
- Kwon, B., Lee, H.-K., & Querfurth, H. W. (2014). Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1843*(7), 1402–13. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.004>
- Kwon, B., & Querfurth, H. (2015). Palmitate activates mTOR/p70S6K through AMPK inhibition and hypophosphorylation of raptor in skeletal muscle cells: Reversal by oleate is similar to metformin. *Biochimie*, *118*, 141–150. <http://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2015.09.006>
- Kwon, C., Sun, J. L., Jeong, J. H., & Jung, T. W. (2020). Humanin attenuates palmitate-induced hepatic lipid accumulation and insulin resistance via AMPK-mediated suppression of the

mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(2), 539–545.

<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.128>

Lam, T., Schwartz, G., & Rossetti, L. (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature*

Neuroscience, 8(5), 579–84. <http://doi.org/10.1038/NN1456>

Lam, T., Yoshii, H., Haber, C., Bogdanovic, E., Lam, L., Fantus, I., & Giacca, A. (2002). Free fatty acid-

induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *American*

Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 283(4), E682-91.

<http://doi.org/10.1152/AJPENDO.00038.2002>

Lanzillotta, C., Tramutola, A., Di Giacomo, G., Marini, F., Butterfield, D. A., Di Domenico, F., ...

Barone, E. (2021). Insulin resistance, oxidative stress and mitochondrial defects in Ts65dn

mice brain: A harmful synergistic path in down syndrome. *Free Radical Biology & Medicine*,

165, 152–170. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.042>

Lavau, M., Fried, S. K., Susini, C., & Freychet, P. (1979). Mechanism of insulin resistance in

adipocytes of rats fed a high-fat diet. *Journal of Lipid Research*, 20(1), 8–16. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/438656>

Le Foll, C., Irani, B. G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. A., & Levin, B. E. (2009). Characteristics and

mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *American Journal of Physiology-*

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 297(3), R655–R664.

<http://doi.org/10.1152/ajpregu.00223.2009>

Lee, S., Tong, M., Hang, S., Deochand, C., & de la Monte, S. (2013). CSF and brain indices of insulin

resistance, oxidative stress and neuro-inflammation in early versus late Alzheimer's disease.

Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism, 3, 128. <http://doi.org/10.4172/2161->

0460.1000128

Lemus, M. B., Bayliss, J. A., Lockie, S. H., Santos, V. V., Reichenbach, A., Stark, R., & Andrews, Z. B.

(2015). A Stereological Analysis of NPY, POMC, Orexin, GFAP Astrocyte, and Iba1 Microglia Cell Number and Volume in Diet-Induced Obese Male Mice. *Endocrinology*, *156*(5), 1701–1713. <http://doi.org/10.1210/en.2014-1961>

Li, M., Vienberg, S. G., Bezy, O., O'Neill, B. T., & Kahn, C. R. (2015). Role of PKC δ in Insulin

Sensitivity and Skeletal Muscle Metabolism. *Diabetes*, *64*(12), 4023–32.

<http://doi.org/10.2337/db14-1891>

Lipp, P., & Reither, G. (2011). Protein kinase C: the “masters” of calcium and lipid. *Cold Spring*

Harbor Perspectives in Biology, *3*(7), a004556.

<http://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004556>

Liu, J., Chang, F., Li, F., Fu, H., Wang, J., Zhang, S., ... Yin, D. (2015). Palmitate promotes autophagy

and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochemical and Biophysical*

Research Communications, *463*(3), 262–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.042>

Liu, L., Brown, J. C., Webster, W. W., Morrisett, R. A., & Monaghan, D. T. (1995). Insulin potentiates

N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus.

Neuroscience Letters, *192*(1), 5–8. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11593-I](http://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11593-I)

Liu, L., Martin, R., & Chan, C. (2013). Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase

increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiology of Aging*, *34*(2),

540–550. <http://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2012.05.017>

Liu, M., Clarke, C. J., Salama, M. F., Choi, Y. J., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2017). Co-ordinated

- activation of classical and novel PKC isoforms is required for PMA-induced mTORC1 activation. *PLoS One*, 12(9), e0184818. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0184818>
- Liu, S. (1999). Cooperation of a “reactive oxygen cycle” with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain--superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(4), 367–76. <http://doi.org/10.1023/A:1018650103259>
- Liu, W.-C., Wu, C.-W., Tain, Y.-L., Fu, M.-H., Hung, C.-Y., Chen, I.-C., ... Wu, K. L. H. (2018). Oral pioglitazone ameliorates fructose-induced peripheral insulin resistance and hippocampal gliosis but not restores inhibited hippocampal adult neurogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1864(1), 274–285. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.017>
- Liu, Z., Patil, I., Sancheti, H., Yin, F., & Cadenas, E. (2017). Effects of lipoic acid on high-fat diet-induced alteration of synaptic plasticity and brain glucose metabolism: A PET/CT and ¹³C-NMR Study. *Scientific Reports*, 7(1), 5391. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-05217-z>
- López-Gómez, C., Santiago-Fernández, C., García-Serrano, S., García-Escobar, E., Gutiérrez-Repiso, C., Rodríguez-Díaz, C., ... García-Fuentes, E. (2020). Oleic acid protects against insulin resistance by regulating the genes related to the PI3K signaling pathway. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8). <http://doi.org/10.3390/jcm9082615>
- Ly, L. D., Xu, S., Choi, S.-K., Ha, C.-M., Thoudam, T., Cha, S.-K., ... Park, K.-S. (2017). Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(2), e291–e291. <http://doi.org/10.1038/emm.2016.157>
- Maesako, M., Uemura, M., Tashiro, Y., Sasaki, K., Watanabe, K., Noda, Y., ... Kinoshita, A. (2015). High Fat Diet Enhances β -Site Cleavage of Amyloid Precursor Protein (APP) via Promoting β -

- Site APP Cleaving Enzyme 1/Adaptor Protein 2/Clathrin Complex Formation. *PLOS ONE*, 10(9), e0131199. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0131199>
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., & Goldstein, B. J. (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21938–42. <http://doi.org/10.1074/jbc.C100109200>
- Mahfouz, R., Khoury, R., Blachnio-Zabielska, A., Turban, S., Loiseau, N., Lipina, C., ... Hajduch, E. (2014). Characterising the Inhibitory Actions of Ceramide upon Insulin Signaling in Different Skeletal Muscle Cell Models: A Mechanistic Insight. *PLoS ONE*, 9(7), e101865. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101865>
- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., & Buono, P. (2015). Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. *Molecules*, 20(9), 17339–17361. <http://doi.org/10.3390/molecules200917339>
- Marafie, S., Al-Shawaf, E., Abubaker, J., & Arefanian, H. (2019). Palmitic acid-induced lipotoxicity promotes a novel interplay between Akt-mTOR, IRS-1, and FFAR1 signaling in pancreatic β -cells. *Biological Research*, 52(1). <http://doi.org/10.1186/S40659-019-0253-4>
- Mayer, C. M., & Belsham, D. D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: Rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 151(2), 576–585. <http://doi.org/10.1210/en.2009-1122>
- Mazzei, G., Ikegami, R., Abolhassani, N., Haruyama, N., Sakumi, K., Saito, T., ... Nakabeppu, Y. (2021). A high-fat diet exacerbates the Alzheimer's disease pathology in the hippocampus of

the *App*^{NL-F/NL-F} knock-in mouse model. *Aging Cell*, 20(8), e13429.

<http://doi.org/10.1111/accel.13429>

McEwen, B. S., & Reagan, L. P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *European Journal of Pharmacology*, 490(1–3), 13–24. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.041>

McFadden, J. W., Aja, S., Li, Q., Bandaru, V. V. R., Kim, E.-K., Haughey, N. J., ... Ronnett, G. V. (2014). Increasing fatty acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS ONE*, 9(12), e115642. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115642>

McLean, F. H., Campbell, F. M., Langston, R. F., Sergi, D., Resch, C., Grant, C., ... Williams, L. M. (2019). A high-fat diet induces rapid changes in the mouse hypothalamic proteome. *Nutrition & Metabolism*, 16(1), 26. <http://doi.org/10.1186/s12986-019-0352-9>

Meckfessel, M., & Brandt, S. (2014). The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(1), 177–184. <http://doi.org/10.1016/J.JAAD.2014.01.891>

Melo, H., Seixas da Silva, G., Sant'Ana, M., Teixeira, C., Clarke, J., Miya Coreixas, V., ... De Felice, F. (2020). Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α . *Cell Reports*, 30(7), 2180–2194.e8. <http://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.01.072>

Mitchell, R. W., & Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport into the brain: Of fatty acid fables and lipid tails. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 85(5), 293–302. <http://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.007>

- Mitchell, R. W., On, N. H., Del Bigio, M. R., Miller, D. W., & Hatch, G. M. (2011). Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, *117*(4), no-no.
<http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07245.x>
- Miura, A., Kajita, K., Ishizawa, M., Kanoh, Y., Kawai, Y., Natsume, Y., ... Ishizuka, T. (2003). Inhibitory effect of ceramide on insulin-induced protein kinase C ζ translocation in rat adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *52*(1). <http://doi.org/10.1053/META.2003.50011>
- Montasir, E., Yumiko, M., Shotaro, S., Yoko, I., Hiroyuki, H., Takanashi, M., ... Nobutaka, H. (2020). High-fat diet-induced activation of SGK1 promotes Alzheimer's disease-associated tau pathology. *Human Genetics*, *30*(18), 1693–1710. <http://doi.org/10.1101/2020.05.14.095471>
- Morales-Corraliza, J., Wong, H., Mazzella, M. J., Che, S., Lee, S. H., Petkova, E., ... Mathews, P. M. (2016). Brain-wide insulin resistance, tau phosphorylation changes, and hippocampal neprilysin and amyloid- β alterations in a monkey model of Type 1 Diabetes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *36*(15), 4248–58.
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4640-14.2016>
- Mordier, S., & Iyengar, P. (2007). Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 and insulin resistance induced by palmitate in hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(1), 206–211. <http://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.08.004>
- Moschella, P. C., Rao, V. U., McDermott, P. J., & Kuppuswamy, D. (2007). Regulation of mTOR and S6K1 activation by the nPKC isoforms, PKC ϵ and PKC δ , in adult cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *43*(6), 754–66.
<http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.09.015>

- Moser, M. D., Matsuzaki, S., & Humphries, K. M. (2009). Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 488(1), 69–75. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2009.06.009>
- Murillo-Maldonado, J. M., Zeineddine, F. B., Stock, R., Thackeray, J., & Riesgo-Escovar, J. R. (2011). Insulin receptor-mediated signaling via phospholipase C- γ regulates growth and differentiation in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(11), e28067. <http://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028067>
- Murphy, E. J., Owada, Y., Kitanaka, N., Kondo, H., & Glatz, J. F. C. (2005). Brain Arachidonic Acid Incorporation Is Decreased in Heart Fatty Acid Binding Protein Gene-Ablated Mice[†]. *Biochemistry*, 44(16), 6350–6360. <http://doi.org/10.1021/bi047292r>
- Murphy, M. G., Jollimore, C., Crocker, J. F. S., & Her, H. (1992). Beta-Oxidation of [1-¹⁴C]palmitic acid by mouse astrocytes in primary culture: Effects of agents implicated in the encephalopathy of Reye's syndrome. *Journal of Neuroscience Research*, 33(3), 445–454. <http://doi.org/10.1002/jnr.490330310>
- Musser, D., & Oseroff, A. (1994). The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with Photofrin II. *Photochemistry and Photobiology*, 59(6), 621–626. <http://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1994.TB09666.X>
- Nalecz, K., Miecz, D., Berezowski, V., & Cecchelli, R. (2004). Carnitine: transport and physiological functions in the brain. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5–6), 551–567. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.001>
- Nawaratne, R., Gray, A., Jørgensen, C. H., Downes, C. P., Siddle, K., & Sethi, J. K. (2006). Regulation

of insulin receptor substrate 1 pleckstrin homology domain by protein kinase C: role of serine 24 phosphorylation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(8), 1838–52.

<http://doi.org/10.1210/me.2005-0536>

Nelson, D., & Cox, M. (2005). Lipid Biosynthesis. In *Principles of Biochemistry* (pp. 787–815).

Neugroschl, J., & Davis, K. L. (2002). Biological markers in Alzheimer disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry : Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 10(6), 660–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427575>

Nisr, R. B., & Affourtit, C. (2016). Palmitate-induced changes in energy demand cause reallocation of ATP supply in rat and human skeletal muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857(9), 1403–1411. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.04.286>

Nolan, C. J., Madiraju, M. S. R., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.-L., & Prentki, M. (2006). Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*, 55 Suppl 2, S16-23. <http://doi.org/10.2337/db06-s003>

North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–67. <http://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2002>

Ochiai, Y., Uchida, Y., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Aizawa, S., & Terasaki, T. (2017). The blood-brain barrier fatty acid transport protein 1 (FATP1/SLC27A1) supplies docosahexaenoic acid to the brain, and insulin facilitates transport. *Journal of Neurochemistry*, 141(3), 400–412. <http://doi.org/10.1111/jnc.13943>

Oh, H., Boghossian, S., York, D., & Park-York, M. (2013). The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Research*,

1537, 191–200. <http://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2013.09.025>

Oh, W. J., & Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*, *10*(14), 2305.

<http://doi.org/10.4161/CC.10.14.16586>

Ono, H., Pocai, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, J., ... Rossetti, L. (2008). Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(8), 2959–68. <http://doi.org/10.1172/JCI34277>

Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., & Lyakhovich, V. (2014). Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *BioMed Research International*, *2014*.

<http://doi.org/10.1155/2014/472459>

Pataky, M., Wang, H., Yu, C., Arias, E., Ploutz-Snyder, R., Zheng, X., & Cartee, G. (2017). High-Fat Diet-Induced insulin resistance in single skeletal muscle fibers is fiber type selective. *Scientific Reports*, *7*(1). <http://doi.org/10.1038/S41598-017-12682-Z>

Patil, S., Melrose, J., & Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(8), 2131. <http://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05797.X>

Pearson-Leary, J., Jahagirdar, V., Sage, J., & McNay, E. C. (2018). Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behavioural Brain Research*, *338*, 32–39. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.033>

Pearson, H. A., & Peers, C. (2006). Physiological roles for amyloid β peptides. *The Journal of Physiology*, *575*(Pt 1), 5. <http://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2006.111203>

Pereira, S., & Alvarez-Leite, J. (2014). Low-grade inflammation, obesity, and diabetes. *Current*

Obesity Reports, 3(4), 422–31. <http://doi.org/10.1007/S13679-014-0124-9>

Persiyantseva, N. A., Storozhevych, T. P., Senilova, Y. E., Gorbacheva, L. R., Pinelis, V. G., & Pomytkin, I. A. (2013). Mitochondrial H₂O₂ as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *Journal of Molecular Signaling*, 8(1), 11. <http://doi.org/10.1186/1750-2187-8-11>

Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 165–9. <http://doi.org/10.1172/JCI10582>

Pilitsis, J., Diaz, F., Wellwood, J., Oregan, M., Fairfax, M., Phillis, J., & Coplin, W. (2001). Quantification of free fatty acids in human cerebrospinal fluid. *Neurochemical Research*, 26(12), 1265–70. <http://doi.org/10.1023/A:1014227231130>

Plum, L., Schubert, M., & Brüning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 16(2), 59–65. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>

Pomytkin, I. A., & Kolesova, O. E. (2003). Effect of insulin on the rate of hydrogen peroxide generation in mitochondria. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 135(6), 541–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937667>

Posey, K., Clegg, D., Printz, R., Byun, J., Morton, G., Vivekanandan-Giri, A., ... Niswender, K. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 296(5), E1003-12. <http://doi.org/10.1152/AJPENDO.90377.2008>

- Powell, D. J., Turban, S., Gray, A., Hajduch, E., & Hundal, H. S. (2004). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *The Biochemical Journal*, *382*(Pt 2), 619–29. <http://doi.org/10.1042/BJ20040139>
- Qiu, W., Walsh, D., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M., ... Selkoe, D. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(49). <http://doi.org/10.1074/JBC.273.49.32730>
- Rahman, M. S., Hossain, K. S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E. O., Rahman, M. A., ... Pang, M.-G. (2021). Role of insulin in health and disease: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12). <http://doi.org/10.3390/ijms22126403>
- Reagan, L., Cowan, H., Woodruff, J., Piroli, G., Erichsen, J., Evans, A., ... Grillo, C. (2021). Hippocampal-specific insulin resistance elicits behavioral despair and hippocampal dendritic atrophy. *Neurobiology of Stress*, *15*, 100354. <http://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2021.100354>
- Reynolds, C. P., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Reynolds, D. A., Ross, R. A., Frenkel, E. P., & Smith, R. G. (1986). Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, *76*(3), 375–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3456456>
- Ribeiro, M. C., Peruchetti, D. B., Silva, L. S., Silva-Filho, J. L., Souza, M. C., Henriques, M. das G., ... Pinheiro, A. A. S. (2018). LPS Induces mTORC1 and mTORC2 Activation During Monocyte Adhesion. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *5*, 67. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00067>
- Robert, J., Montaudon, D., & Hugues, P. (1983). Incorporation and metabolism of exogenous fatty

acids by cultured normal and tumoral glial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 752(3), 383–395. [http://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90268-0](http://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90268-0)

Roque, P., Hooshmandi, M., Neagu-Lund, L., Yin, S., Yousefpour, N., Sato, H., ... Khoutorsky, A. (2021). Intranasal insulin rescues repeated anesthesia-induced deficits in synaptic plasticity and memory and prevents apoptosis in neonatal mice via mTORC1. *Scientific Reports*, 11(1), 15490. <http://doi.org/10.1038/S41598-021-94849-3>

Rosner, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., & Hengstschläger, M. (2010). mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids*, 38(1), 223–8. <http://doi.org/10.1007/s00726-008-0230-7>

Ruddock, M. W., Stein, A., Landaker, E., Park, J., Cooksey, R. C., McClain, D., & Patti, M.-E. (2008). Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. *Journal of Biochemistry*, 144(5), 599–607. <http://doi.org/10.1093/jb/mvn105>

Rumora, A. E., Lentz, S. I., Hinder, L. M., Jackson, S. W., Valesano, A., Levinson, G. E., & Feldman, E. L. (2018). Dyslipidemia impairs mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *The FASEB Journal*, 32(1), 195–207. <http://doi.org/10.1096/fj.201700206R>

Rumora, A. E., LoGrasso, G., Haidar, J. A., Dolkowski, J. J., Lentz, S. I., & Feldman, E. L. (2019). Chain length of saturated fatty acids regulates mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *Journal of Lipid Research*, 60(1), 58–70. <http://doi.org/10.1194/jlr.M086843>

Rumora, A. E., LoGrasso, G., Hayes, J. M., Mendelson, F. E., Tabbey, M. A., Haidar, J. A., ... Feldman, E. L. (2019). The Divergent Roles of Dietary Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on Nerve Function in Murine Models of Obesity. *The Journal of Neuroscience : The Official*

Journal of the Society for Neuroscience, 39(19), 3770–3781.

<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3173-18.2019>

Sampson, S. R., & Cooper, D. R. (2006). Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Molecular Genetics and Metabolism*, 89(1–2), 32–47.

<http://doi.org/10.1016/J.YMGME.2006.04.017>

Sánchez-Alegría, K., Flores-León, M., Avila-Muñoz, E., Rodríguez-Corona, N., & Arias, C. (2018).

PI3K signaling in neurons: A central node for the control of multiple functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3725. <http://doi.org/10.3390/ijms19123725>

Saraswathi, V., Kumar, N., Gopal, T., Bhatt, S., Ai, W., Ma, C., ... Desouza, C. (2020). Lauric acid versus palmitic acid: Effects on adipose tissue inflammation, insulin resistance, and non alcoholic fatty liver disease in obesity. *Biology*, 9(11). <http://doi.org/10.3390/biology9110346>

Sarbassov, D., Guertin, D., Ali, S., & Sabatini, D. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712).

<http://doi.org/10.1126/SCIENCE.1106148>

Sasaoka, T., & Kobayashi, M. (2000). The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocrine Journal*, 47(4), 373–81.

<http://doi.org/10.1507/endocrj.47.373>

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960. <http://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.004>

Schmid, E., El Benna, J., Galter, D., Klein, G., & Dröge, W. (1998). Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin

responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(10), 863–70.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657526>

Schnell, S., Schaefer, M., & Schöfl, C. (2007). Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1–2), 173–180. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2006.09.013>

Schönfeld, P., & Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(10), 1493.
<http://doi.org/10.1038/JCBFM.2013.128>

Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2008). Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(3).
<http://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.04.029>

Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular Cell*, 40(2), 310.
<http://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.09.026>

Sergi, D., Luscombe-Marsh, N., Naumovski, N., Abeywardena, M., & O'Callaghan, N. (2021). Palmitic Acid, but Not Lauric Acid, Induces Metabolic Inflammation, Mitochondrial Fragmentation, and a Drop in Mitochondrial Membrane Potential in Human Primary Myotubes. *Frontiers in Nutrition*, 8, 663838. <http://doi.org/10.3389/fnut.2021.663838>

Shah, O., Wang, Z., & Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current*

Biology : CB, 14(18), 1650–6. <http://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.08.026>

Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershinkel, M., & Walker, M. D. (2005). Role of GPR40 in fatty acid action on the β cell line INS-1E. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(1), 97–104. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.042>

Sheehy, T., & Sharma, S. (2010). The nutrition transition in Barbados: trends in macronutrient supply from 1961 to 2003. *British Journal of Nutrition*, 104(8), 1222–1229. <http://doi.org/10.1017/S0007114510002011>

Sierra, A. Y., Gratacós, E., Carrasco, P., Clotet, J., Ureña, J., Serra, D., ... Casals, N. (2008). CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6878–6885. <http://doi.org/10.1074/jbc.M707965200>

Skeberdis, V. A., Lan, J., Zheng, X., Zukin, R. S., & Bennett, M. V. (2001). Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3561–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.051634698>

Slater, T., Sawyer, B., & Straeuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8(77), 383–93. [http://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90513-4](http://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90513-4)

Small, L., Brandon, A., Turner, N., & Cooney, G. (2018). Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 314(3). <http://doi.org/10.1152/AJPENDO.00337.2017>

- Snowden, S. G., Ebshiana, A. A., Hye, A., An, Y., Pletnikova, O., O'Brien, R., ... Thambisetty, M. (2017). Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLOS Medicine*, *14*(3), e1002266. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002266>
- Sokolowska, E., & Blachnio-Zabielska, A. (2019). The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 577. <http://doi.org/10.3389/fendo.2019.00577>
- Spector, R. (1988). Fatty acid transport through the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, *50*(2), 639–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3335863>
- Speijer, D. (2011). Oxygen radicals shaping evolution: Why fatty acid catabolism leads to peroxisomes while neurons do without it. *BioEssays*, *33*(2), 88–94. <http://doi.org/10.1002/bies.201000097>
- Spinelli, M., Fusco, S., Mainardi, M., Scala, F., Natale, F., Lapenta, R., ... Grassi, C. (2017). Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nature Communications*, *8*(1), 2009. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-02221-9>
- Sripetchwandee, J., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. (2018). Links Between Obesity-Induced Brain Insulin Resistance, Brain Mitochondrial Dysfunction, and Dementia. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. <http://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00496>
- Stern, J., Johnson, P., Batchelor, B., Zucker, L., & Hirsch, J. (1975). Pancreatic insulin release and peripheral tissue resistance in Zucker obese rats fed high- and low-carbohydrate diets. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *228*(2), 543–548. <http://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.228.2.543>

- Storozhevych, T. P., Senilova, Y. E., Persiyantseva, N. A., Pinelis, V. G., & Pomytkin, I. A. (2007). Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neuroscience*, *8*(1), 84. <http://doi.org/10.1186/1471-2202-8-84>
- Summers, S. A., Chaurasia, B., & Holland, W. L. (2019). Metabolic Messengers: ceramides. *Nature Metabolism*, *1*(11), 1051–1058. <http://doi.org/10.1038/s42255-019-0134-8>
- Sun, X., Yao, H., Douglas, R. M., Gu, X. Q., Wang, J., & Haddad, G. G. (2010). Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *Journal of Neurochemistry*, *112*(2), 377–388. <http://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06450.X>
- Sun, Y., Wang, J., Guo, X., Zhu, N., Niu, L., Ding, X., ... Yang, F. (2021). Oleic acid and eicosapentaenoic acid reverse palmitic acid-induced insulin resistance in human HepG2 cells via the reactive oxygen species / JUN Pathway. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.06.005>
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., & Fukuuchi, Y. (2002). Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry International*, *40*(5), 441–448. [http://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00097-3](http://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00097-3)
- Takalo, M., Haapasalo, A., Martiskainen, H., Kurkinen, K., Koivisto, H., Miettinen, P., ... Hiltunen, M. (2014). High-fat diet increases tau expression in the brain of T2DM and AD mice independently of peripheral metabolic status. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(6), 634–41. <http://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2014.02.003>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *The*

Journal of Cell Biology, 217(7), 2273–2289. <http://doi.org/10.1083/jcb.201802095>

Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J., & Ngo, S. T. (2018). Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <http://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00010>

Tremblay, F., Brûlé, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., ... Marette, A. (2007). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), 14056–61. <http://doi.org/10.1073/PNAS.0706517104>

Tretter, L., & Adam-Vizi, V. (2000). Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(24). <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-08972.2000>

Trombetta, A., Togliatto, G., Rosso, A., Dentelli, P., Olgasi, C., Cotogni, P., & Brizzi, M. F. (2013). Increase of Palmitic Acid Concentration Impairs Endothelial Progenitor Cell and Bone Marrow–Derived Progenitor Cell Bioavailability: Role of the STAT5/PPAR γ Transcriptional Complex. *Diabetes*, 62(4), 1245. <http://doi.org/10.2337/DB12-0646>

Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(2), 117–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804620>

Uchida, Y., & Park, K. (2021). Ceramides in skin health and disease: An update. *American Journal of*

Clinical Dermatology. <http://doi.org/10.1007/S40257-021-00619-2>

Vázquez-Jiménez, J., Roura-Guiberna, A., Jiménez-Mena, L., & Olivares-Reyes, J. (2017). El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gaceta Médica de México*, *153*(7).

<http://doi.org/10.24875/GMM.17002714>

Vessby, B. (2003). Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome.

Current Opinion in Lipidology, *14*(1), 15–9.

<http://doi.org/10.1097/01.mol.0000052859.26236.5f>

Wang, J., Zou, Q., Suo, Y., Tan, X., Yuan, T., Liu, Z., & Liu, X. (2019). Lycopene ameliorates systemic inflammation-induced synaptic dysfunction via improving insulin resistance and mitochondrial dysfunction in the liver-brain axis. *Food & Function*, *10*(4), 2125–2137.

<http://doi.org/10.1039/c8fo02460j>

Wang, L., Folsom, A. R., Zheng, Z.-J., Pankow, J. S., Eckfeldt, J. H., & ARIC Study Investigators.

(2003). Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(1), 91–98. <http://doi.org/10.1093/ajcn/78.1.91>

Wang, L., Xu, F., Song, Z., Han, D., Zhang, J., Chen, L., & Na, L. (2020). A high fat diet with a high C18:0/C16:0 ratio induced worse metabolic and transcriptomic profiles in C57BL/6 mice.

Lipids in Health and Disease, *19*(1), 172. <http://doi.org/10.1186/s12944-020-01346-z>

Wang, M., Yoon, G., Song, J., & Jo, J. (2021). Exendin-4 improves long-term potentiation and neuronal dendritic growth in vivo and in vitro obesity condition. *Scientific Reports*, *11*(1),

8326. <http://doi.org/10.1038/s41598-021-87809-4>

- Wang, X., Yu, W., Nawaz, A., Guan, F., Sun, S., & Wang, C. (2010). Palmitate induced insulin resistance by PKC θ -dependent activation of mTOR/S6K pathway in C2C12 myotubes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes : Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 118(9), 657–61. <http://doi.org/10.1055/S-0030-1252069>
- Watson, G. S., Peskind, E. R., Asthana, S., Purganan, K., Wait, C., Chapman, D., ... Craft, S. (2003). Insulin increases CSF A β 42 levels in normal older adults. *Neurology*, 60(12), 1899–903. <http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000065916.25128.25>
- Weinstein, G., Maillard, P., Himali, J. J., Beiser, A. S., Au, R., Wolf, P. A., ... DeCarli, C. (2015). Glucose indices are associated with cognitive and structural brain measures in young adults. *Neurology*, 84(23), 2329–37. <http://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001655>
- White, M. F. (1994). The IRS-1 signaling system. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(1), 47–54. [http://doi.org/10.1016/0959-437X\(94\)90090-6](http://doi.org/10.1016/0959-437X(94)90090-6)
- White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40(0), S2–S17. <http://doi.org/10.1007/s001250051387>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 26(2), 19–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278749>
- Willmann, C., Brockmann, K., Wagner, R., Kullmann, S., Preissl, H., Schnauder, G., ... Heni, M. (2020). Insulin sensitivity predicts cognitive decline in individuals with prediabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(2), e001741. <http://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001741>
- Wohua, Z., & Weiming, X. (2019). Glutaredoxin 2 (GRX2) deficiency exacerbates high fat diet

(HFD)-induced insulin resistance, inflammation and mitochondrial dysfunction in brain injury: A mechanism involving GSK-3 β . *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 118. <http://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108940>

Won, G., Choi, S., Kang, C., & Kim, G. (2021). Lactiplantibacillus plantarum MG4296 and Lacticaseibacillus paracasei MG5012 ameliorates insulin resistance in palmitic acid-induced HepG2 cells and high fat diet-induced mice. *Microorganisms*, 9(6).
<http://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061139>

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., & Zou, M. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9777–9788. <http://doi.org/10.1074/JBC.M608310200>

Yang, C., Aye, C. C., Li, X., Diaz Ramos, A., Zorzano, A., & Mora, S. (2012). Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Bioscience Reports*, 32(5), 465–478.
<http://doi.org/10.1042/BSR20120034>

Yang, L., Guan, G., Lei, L., Liu, J., Cao, L., & Wang, X. (2019). Oxidative and endoplasmic reticulum stresses are involved in palmitic acid-induced H9c2 cell apoptosis. *Bioscience Reports*, 39(5).
<http://doi.org/10.1042/BSR20190225>

Yang, S. Y., He, X. Y., & Schulz, H. (1987). Fatty acid oxidation in rat brain is limited by the low activity of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(27), 13027–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3654601>

Yau, P. L., Castro, M. G., BS, Tagani, A., Tsui, W. H., & Convit, A. (2012). Obesity and metabolic syndrome and functional and structural brain impairments in adolescence. *Pediatrics*, 130(4),

e856. <http://doi.org/10.1542/PEDS.2012-0324>

Yau, P. L., Javier, D. C., Ryan, C. M., Tsui, W. H., Ardekani, B. A., Ten, S., & Convit, A. (2010).

Preliminary evidence for brain complications in obese adolescents with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, *53*(11), 2298–306. <http://doi.org/10.1007/s00125-010-1857-y>

Yim, S. H., Monsma, S., Hertz, L., & Szuchet, S. (1986). Lipid and glycolipid metabolism of cultured astrocytes: A time course study. *Journal of Neuroscience Research*, *15*(1), 29–37.

<http://doi.org/10.1002/jnr.490150104>

Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., ... Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated

phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(52),

50230–50236. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200958200>

Yujie, G., Xiaojun, M., Pengfei, L., Shengqi, D., Xiaochen, H., Ren, X., & Yuan, L. (2020). High-fat diet induced discrepant peripheral and central nervous systems insulin resistance in

APPswe/PS1dE9 and wild-type C57BL/6J mice. *Aging*, *13*(1), 1236–1250.

<http://doi.org/10.18632/aging.202262>

Yuzefovych, L., Solodushko, V., Wilson, G., & Racheck, L. (2012). Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial

dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells.

Endocrinology, *153*(1). <http://doi.org/10.1210/EN.2011-1442>

Yuzefovych, L., Wilson, G., & Racheck, L. (2010). Different effects of oleate vs. palmitate on

mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *299*(6).

<http://doi.org/10.1152/AJPENDO.00238.2010>

- Zamarbide, M., Etayo-Labiano, I., Ricobaraza, A., Martínez-Pinilla, E., Aymerich, M. S., Luis Lanciego, J., ... Franco, R. (2014). GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. *Hippocampus*, *24*(7), 733–739. <http://doi.org/10.1002/hipo.22263>
- Zeng, Z., Sarbassov, D. D., Samudio, I. J., Yee, K. W. L., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., ... Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*, *109*(8), 3509–12. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030833>
- Zhang, J., Gao, Z., Yin, J., Quon, M. J., & Ye, J. (2008). S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(51), 35375–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.M806480200>
- Zhang, Y.-J., Zhao, H., Dong, L., Zhen, Y.-F., Xing, H.-Y., Ma, H.-J., & Song, G.-Y. (2019). Resveratrol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and fatty acid oxidation via ATM-AMPK axis in skeletal muscle. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *23*(20), 9117–9125. http://doi.org/10.26355/eurev_201910_19315
- Zhao, H., Wu, C., Zhang, X., Wang, L., Sun, J., & Zhuge, F. (2019). Insulin resistance is a risk factor for mild cognitive impairment in elderly adults with T2DM. *Open Life Sciences*, *14*(1), 255–261. <http://doi.org/10.1515/biol-2019-0029>
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., & Alkon, D. L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(49), 34893–902. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574963>

Zywno, H., Bzdega, W., Kolakowski, A., Kurzyna, P., Harasim-Symbor, E., Sztolsztener, K., ...

Konstantynowicz-Nowicka, K. (2021). The influence of coumestrol on sphingolipid signaling pathway and insulin resistance development in primary rat hepatocytes. *Biomolecules*, 11(2).

<http://doi.org/10.3390/biom11020268>

1. Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production

Neurochemistry International 110 (2017) 75–83



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci



Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production



Erika Calvo-Ochoa¹, Karina Sánchez-Alegría¹, Cecilia Gómez-Inclán, Patricia Ferrera, Clorinda Arias*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2017
Received in revised form
23 August 2017
Accepted 13 September 2017
Available online 15 September 2017

Keywords:

Palmitic acid
Insulin resistance
Mitochondrial ROS
mTOR
Human neuroblastoma cells
Cortical neurons
Energy metabolism

ABSTRACT

The high consumption of saturated lipids has been largely associated with the increasing prevalence of metabolic diseases. In particular, saturated fatty acids such as palmitic acid (PA) have been implicated in the development of insulin resistance in peripheral tissues. However, how neurons develop insulin resistance in response to lipid overload is not fully understood. Here, we used cultured rat cortical neurons and differentiated human neuroblastoma cells to demonstrate that PA blocks insulin-induced metabolic activation, inhibits the activation of the insulin/PI3K/Akt pathway and activates mTOR kinase downstream of Akt. Despite the fact that fatty acids are not normally used as a significant source of fuel by neural cells, we also found that short-term neuronal exposure to PA reduces the NAD⁺/NADH ratio, indicating that PA modifies the neuronal energy balance. Finally, inhibiting mitochondrial ROS production with mitoTEMPO prevented the deleterious effect of PA on insulin signaling. This work provides novel evidence of the mechanisms behind saturated fatty acid-induced insulin resistance and its metabolic consequences on neuronal cells.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The chronic consumption of diets rich in saturated fats is thought to promote a variety of metabolic disorders including obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus (Calvo-Ochoa and Arias, 2015). Presenting one or more of these diseases poses an increased risk of developing mild cognitive impairment, dementia and Alzheimer's disease, as shown by numerous epidemiological studies (Craft, 2007; Matsuzaki et al., 2010; Sima, 2010; Schrijvers et al., 2010; Umegaki, 2010; Viscogliosi et al., 2012; Gudala et al., 2013; Calvo-Ochoa and Arias, 2015; Hoscheidt et al., 2016). Although neurons are not insulin-dependent, they are insulin-responsive. In this sense it has been extensively shown that insulin plays a pivotal role in cortical and hippocampal neuronal function as a metabolic, growth, synaptic and survival modulator (Werther et al., 1989; Zhao et al., 1999;

Biessels and Reagan, 2015). Additionally, insulin plays a role in enhancing memory and establishing long-term potentiation (LTP) through several molecular mechanisms that include neurotransmitter release, expression and insertion of receptors at the post-synaptic membrane and expression of post-synaptic proteins, mainly via the PI3K/Akt signaling pathway (Bingham et al., 2002; Calvo-Ochoa and Arias, 2015; Gralle, 2017). It has been reported that rodents fed high-fat diets (HFD) develop systemic as well as neuronal insulin resistance in the hippocampus and the hypothalamus. The insulin resistant state in these cerebral regions is accompanied by several molecular and neuronal alterations that have been associated with hippocampal learning and memory deficits and with a hypothalamus-mediated suppression of glucose production by the liver (Ono et al., 2008; Calvo-Ochoa et al., 2014). Although many studies have analyzed the effect of HFD feeding on structural and cognitive changes in humans and animal models, it is still unknown which components of the HFD are mainly responsible for the establishment of insulin resistance in neurons. Increasing evidence suggests that chronic elevation of plasma free fatty acids (FFAs), particularly the saturated type, is responsible for

* Corresponding author.

E-mail address: carias@unam.mx (C. Arias).

¹ These authors contributed equally to this work.

the systemic insulin resistance observed in metabolic diseases due to HFD feeding (Kurotani et al., 2012). In particular, palmitic acid (PA), the most abundant saturated fatty acid present in HFD, has been shown to directly induce insulin resistance in several tissues and cellular lines (Lee et al., 2010; Mayer and Belsham, 2010; Ishii et al., 2015). There is little information on the effects of PA on the brain, and most studies have focused on hypothalamic neurons since they sense the nutritional and metabolic information of the body. It has been shown that PA causes insulin resistance *in vivo* and *in vitro* in these neurons (Benoit et al., 2009; Posey et al., 2009). Few studies have addressed the effect of PA on insulin resistance in different type of neuronal cells (Kwon et al., 2014), and the mechanisms underlying such an effect remain to be determined. Thus, the aim of the present work was to study whether short- and long-term PA exposure produces neuronal insulin resistance as well as the metabolic alterations caused by this exposure to saturated fatty acid and the mechanisms involved in a model of differentiated human neuroblastoma cells and in rat cortical neurons.

2. Methods

2.1. Cell culture

Undifferentiated human neuroblastoma cells (MSN) (Reynolds et al., 1986) were maintained in RPMI 1640 medium containing nonessential amino acids plus 10% fetal bovine serum (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA). The cells were grown at a density of 1×10^6 cells per well in an atmosphere of 5% CO₂/95% O₂ at 37 °C. After 24 h of culture, MSN cells were differentiated to mature neurons by adding retinoic acid (10 μM) and nerve growth factor (NGF; 50 ng/mL) for five days. At the end of this period, fresh medium was added and the neurons were exposed to PA for 1 or 24 h as described below. Differentiated human neurons express a more mature neuron-like phenotype with long, extensively branched neurites and mature neuronal markers, such as NeuN (Shipley et al., 2016).

2.2. Cultured cortical neurons

Cerebral cortical cultures were prepared from 17-day-old embryonic rats. The brains were removed, dissected free of meninges, minced with forceps in phosphate buffered saline (PBS)-glucose solution and incubated with 0.2% trypsin at 37 °C for 30 min. The cortices were mechanically dissociated using a Pasteur pipet, and the pellet was resuspended in Neurobasal medium supplemented with B-12 (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA) with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum. The cells were plated at a density of 1×10^7 cells in plates precoated with poly-L-lysine. Cytosine arabinoside (10 μM) was added to cultures 3 days after plating to inhibit the replication of nonneuronal cells. The cultures were maintained in an atmosphere of 5% CO₂/95% O₂ at 37 °C and used after 7 days *in vitro* (DIV). At the end of this period, fresh medium was added, and the neurons were exposed to PA for 1 h.

2.3. Palmitic acid-BSA complex preparation

We used bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a carrier protein to allow the fatty acids to remain in solution. For this, we prepared an initial stock solution of sodium palmitate 200 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in molecular grade absolute ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and we incubated the solution at 37 °C with occasional shaking until a clear liquid was obtained. This stock solution was stored at –20 °C and used within 2 months. On the day of the experiment, a fresh working solution of 5 mM was made using sterile PBS-BSA 10% and

incubated for at least 30 min at 37 °C with gentle shaking.

2.4. Cell viability assay

Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion assay. After incubation with different concentrations of PA (100, 200 or 500 μM), the cells were harvested in PBS. Ten microliters of this cell solution was obtained and combined with 10 μl of 0.4% trypan blue dye solution (Gibco) for a final 1:1 ratio (v/v). Ten microliters of the resulting solution was loaded into a Neubauer hemocytometer (BRAND, Wertheim, Germany) and the cells were counted. Cells that excluded trypan blue were considered viable.

2.5. Mitochondrial activity assay

We used the reduction of 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions. The reduction of MTT is an indicator of mitochondrial redox capacity and has been used extensively as a measure of cell viability and metabolic activation (Mosmann, 1983). Thus, MTT reduction was employed to determine neuronal metabolic activity in the presence of 24 h (200 μM) or 1 h of PA exposure. After incubation with PA, cells were treated with MTT-PBS (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C in a 1:10 (v/v) ratio. The incubation medium was removed, and the neurons were solubilized with isopropyl alcohol (0.8 mL). The absorbance of each sample was then quantified using a spectrophotometer at 570 nm (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). In both experimental groups, the cells were incubated with insulin (10 μM) for 15 min at 37 °C. For short-term exposure to PA, the culture medium was removed and replaced with serum-free medium to starve the cells for 1 h.

In some experiments the glucose-containing culture medium was removed and the cells were washed twice with pre-warmed glucose-free phosphate buffered solution (PBS). Afterwards, the cells were incubated with the glucose free-PBS and PA for an hour. After this incubation period, insulin (or PBS in control groups) was added for 15 min to promote glucose uptake, and then MTT was added for an additional 30 min. The control group treated with PA and glucose was supplemented with filtered glucose-PBS for a final concentration of 2 g/L, which was equivalent to the concentration present in culture medium, during this incubation period. Next, insulin or PBS was added, and MTT reduction was determined. The kinase inhibitors wortmannin (100 nM) or rapamycin (100 nM) were added for 1 h to the serum-free medium. Then, insulin or PBS was added, and MTT reduction was determined. Some cultures were treated with the mitochondrial antioxidant mitoTEMPO (100 μM), which was added simultaneously with PA or PBS. After 1 h of incubation, the cultures were stimulated with or without insulin, and the MTT reduction was determined.

2.6. Western blotting

Differentiated human MSN cells or rat cortical primary neurons were lysed in 100 μl/well RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.7; 100 mM sodium chloride; 2 mM PMSF; 1% NP-40); complete inhibitor cocktail from Roche Diagnostics and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 4 °C. Protein concentration was determined using a BCA kit (Pierce, Rockford, IL). Lysates were boiled in Laemmli buffer and fractionated on SDS-PAGE 10% acrylamide gel. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, England) under standard conditions. The membranes were then blocked with 5% non-fat-milk-TBS-T and incubated with one of the following primary antibodies at 4 °C overnight in 5% BSA-TBS-T:

anti-pIRS-1 Y608 (1:250 BioSource Invitrogen, USA); anti-pAkt S473 (1:1000 Cell Signaling Technology, USA); anti-phospho-mTOR S2448 (1:1000 BioSource, Invitrogen, USA); or anti- β -actin (1:1000 Sigma-Aldrich). Next, we incubated the membranes with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 2 h at RT in 5% non-fat-milk-TBST-T (anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and the membrane signals were revealed using the chemoluminescent substrate ECL (Millipore, Billerica, MA) on Kodak X-Omat film. Densitometric analysis of the immunoblot was carried out using ImageJ software (NIH). To normalize the data, we divided the values obtained for each band by the respective actin loading control value and obtained a ratio. This value was then converted into the percent of control for each experiment.

2.7. NAD/NADH ratio quantitation

The NAD/NADH ratio was measured using a colorimetric assay (Abcam, Cambridge, UK). The procedure followed the manufacturer's instructions briefly, as follows. After a 24-h incubation with PA, the culture medium was removed, and the cells were washed with cold PBS. The PBS was removed, and 400 μ L of extraction buffer was added. After 2 cycles of freezing/defreezing (20 min on dry ice followed by 10 min at room temperature), the supernatant was transferred to Eppendorf tubes, which were mixed for 10 s and centrifuged at 14 000 rpm for 5 min. The supernatant was collected and maintained on ice. Two hundred microliters of the supernatant was obtained and heated to 60 °C for 30 min. The samples and standard curve assay were placed in ELISA plates. One hundred microliters of a mix containing the NAD cyclase enzyme was added to each well. After a 5-min incubation, 10 μ L of a color-producing solution was added and incubated for 30–90 min before the absorbance at 450 nm was determined. Each sample was read in duplicate.

2.8. Statistical analysis

The results represent the mean \pm SEM. Comparisons among groups were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc test. In some experiments, we analyzed statistical significance using the student's *t*-test. A $p < 0.05$ value was considered significant. We used GraphPad Prism 6.0 (GraphPad) for graphs and statistical analysis.

3. Results

3.1. Metabolic changes by PA exposure in neurons

We first determined whether long-term (24 h) exposure to PA was neurotoxic using the trypan blue exclusion assay (Fig. 1A). We found that 24 h exposure to 500 μ M PA significantly reduced neuronal viability (29.72%, $p < 0.05$). These results show that PA incubation at 100 or 200 μ M is not neurotoxic and additionally, these doses are close to the concentrations found in plasma from obese and diabetic patients (Clare et al., 2002).

To further analyze the effects of PA on insulin signaling, we studied the short- and long-term effects of PA stimulation on insulin-mediated mitochondrial activity. Insulin treatment for 15 min produced a significant increase in the mitochondrial redox capacity, as measured by increased MTT reduction, compared with the non-treated neurons (dashed line) (31.07%, $p < 0.05$) (Fig. 1B). Then, we tested whether 1 h and 24 h PA exposure impaired the insulin-mediated metabolic activation. As shown in Fig. 1B, PA treatment for 1 h significantly increased the metabolic activity by itself (45.85%, $p < 0.01$), but no effect on MTT reduction was found

when neurons were incubated with PA for 24 h (ns vs. ctrl). This metabolic activation was not observed in the presence of the non-metabolizable analog of palmitate, methylpalmitate (Fig. 1B) suggesting that PA may be used by neurons as metabolic fuel that can be detected after short-time exposure, but after 24 h it was not possible to observe the transient mitochondrial activation. Very interestingly, exposure to PA significantly impaired the insulin-dependent mitochondrial activity (ns vs. ctrl, $p < 0.001$ vs. PA 1 h, $p < 0.01$ vs. INS) (Fig. 1B), whereas 24 h exposure to PA had no effect on the insulin-dependent mitochondrial activity (ns vs. INS). These results show that metabolic activation induced by either insulin or short-term treatment with PA becomes impaired when neurons are treated simultaneously with both compounds.

To study whether the increased mitochondrial activity produced by insulin and 1 h PA treatment in human MSN cells was due to glucose entry into the cell, we studied the mitochondrial activity in the absence of glucose. To ensure that the mitochondria were responding in a similar manner albeit in the absence of glucose, we supplemented the media with glucose (2 mg/mL) in both the control and PA groups to serve as controls of metabolic activity. First, we found no differences between the control groups incubated with (dashed line) or without glucose (white bar), suggesting that the basal metabolic response was equivalent in both conditions (Fig. 1C). We also observed no differences in cells treated with insulin in the absence of glucose (ns vs. ctrl), suggesting that glucose entry into the cell is necessary for insulin-mediated mitochondrial activation, as previously described. PA incubation induced a significant increase in mitochondrial activity when incubated without or with glucose (19.67%, $p < 0.05$ and 28.15%, $p < 0.01$, respectively) (Fig. 1C), suggesting that PA increases mitochondrial activity independently of glucose entry into the cell. Additionally, the group co-incubated with PA and insulin showed no difference when compared with the control (ns vs. ctrl) (Fig. 1C), suggesting that impairment of the insulin-mediated mitochondrial activity caused by PA uses a glucose-entry-independent mechanism.

These results point to the possibility that PA may be used by neurons in some conditions as metabolic fuel. To test this hypothesis, we measured the neuronal metabolic activity by means of a NAD/NADH ratio, which determines the cell redox state. We found that both insulin and PA exposure decreased the NAD/NADH ratio (30%) ($p < 0.05$ and $p < 0.051$, respectively) (Fig. 1D).

3.2. Transient exposure to PA inhibits the insulin/PI3K/Akt signaling pathway

Our previous results indicated that 1 h PA exposure impairs insulin-mediated mitochondrial activity. Therefore, we wanted to test whether the short-term effect of PA also down-regulates insulin signaling. We examined the insulin-mediated phosphorylation state of IRS-1^{Y608} and Akt^{S473}, and we found significantly increased phosphorylation of both proteins after insulin exposure (111.35%, $p < 0.05$ and 100.1%, $p < 0.05$), but PA treatment for 1 h completely blocked this effect (69.79% and 51.22%, respectively, compared with the control) (Fig. 2A and B). To analyze the selective effects of PA on insulin signaling, we analyzed the effect of methylpalmitate (Parker et al., 2003), on insulin-mediated Akt activation. As shown in Fig. 2C, exposure to methylpalmitate (200 μ M) did not change the transduction pathway activated by insulin in the presence or absence of PA (78.84% and 75.1%, $p < 0.01$, respectively).

To analyze whether the effect of PA on insulin signaling only occur in these particular differentiated human neuroblastoma cells, we analyzed whether cultured rat cortical neurons behave in a similar manner. As expected, insulin effectively produced transient metabolic activation measured as an increase in MTT reduction, and

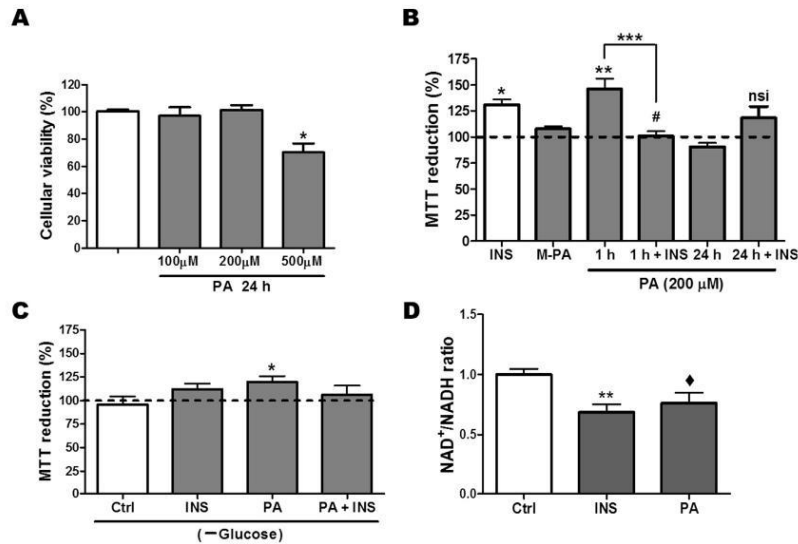


Fig. 1. Effect of long- and short-term PA exposure on neuronal viability and metabolic activation. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay (A). Graphs represent the comparison between control and cells exposed for 24 h to 100, 200 and 500 μM of PA. Mitochondrial activation was evaluated by MTT reduction after insulin (15 min), methylpalmitate (M-PA), PA (1 h or 24 h) or PA + insulin (1 h and 24 h) (B) in the presence and absence of external glucose (C). NAD⁺/NADH ratio was measured after insulin stimulation for 15 min or PA exposure for 1 h (D). Data expressed as the mean percentage \pm SEM of duplicate determinations from 3 to 5 independent experiments. Insulin (INS) stimulation is compared with the non-treated neurons (dashed line, * $p < 0.05$). (# ns vs. ins), (nsi vs. INS) (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ♦ $p < 0.051$).

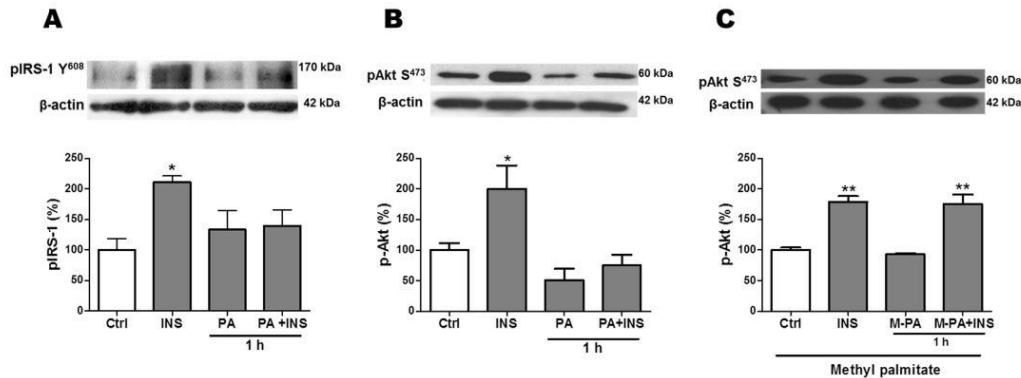


Fig. 2. Short-term exposure to PA inhibits insulin signaling. Western blot of insulin signaling proteins: phospho-Y608-insulin receptor substrate-1 (IRS-1) (A) and phospho-S473-Akt (B) from differentiated human neuroblastoma cells after 1 h exposure to PA (200 μM) in the absence or presence of 15 min insulin (10 μM). To analyze the selective effects of PA on insulin signaling we evaluated phospho-S473-Akt in the presence of methylpalmitate (C). Representative Western blots and densitometric analysis. Mean percentage \pm SEM are shown from 5 independent experiments * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Ctrl.

PA effectively blocked this metabolic activation (ns vs. ctrl) (Fig. 3A), as well as insulin-dependent Akt phosphorylation (Fig. 3B).

3.3. Impairment of insulin-mediated mitochondrial activity by PA requires mTOR and PI3K signaling

The serine/threonine protein kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) is a nutrient sensor and metabolic regulator. It has

been described that mTOR is activated by fatty acids and that this activation, in turn, promotes down-regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation in serine residues by S6K, which is an mTOR effector molecule (Tremblay et al., 2007; Ono et al., 2008; Oh et al., 2013). To examine whether 1 h PA activates mTOR in neurons, we analyzed the levels of phosphorylated mTOR^{S2448}. We found that insulin and PA treatment significantly increased mTOR phosphorylation (24.7%, $p < 0.05$ and 30.4%, $p < 0.05$, respectively)

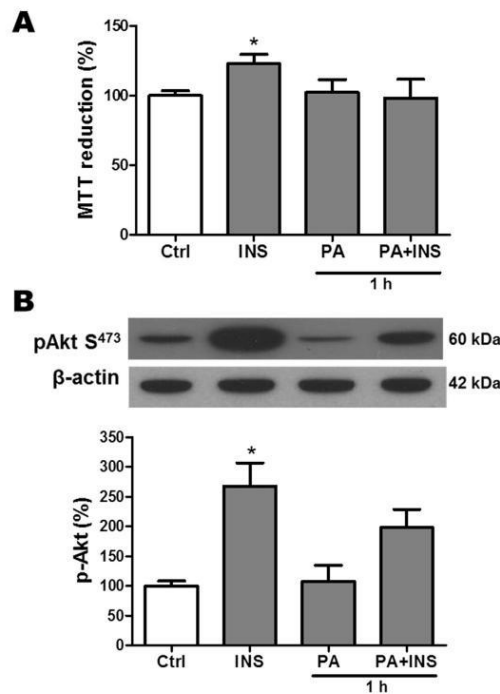


Fig. 3. Short-term exposure to PA inhibits insulin signaling in rat cortical neurons. Mitochondrial activation was evaluated by MTT reduction after insulin (15 min), PA (1 h) or PA + insulin (1 h) (A) Representative western blot and densitometric analysis of phospho-S473-Akt after same conditions (B). Mean percentage \pm SEM are shown from 5 independent experiments * $p < 0.05$, vs. Ctrl.

(Fig. 4A). Very interestingly, PA-dependent mTOR phosphorylation was also observed in the presence of insulin (45.1%, $p < 0.01$ compared to control). Since PA activates mTOR despite blunting of the IRS-1/PI3-K/Akt, we can suggest that PA activates mTOR by an Akt-independent mechanism. These results along with extensive reports of the role of mTOR in inducing insulin resistance led us to study the effect of mTOR inhibition on the impairment of insulin-mediated mitochondrial activity by PA. Rapamycin, a specific mTOR inhibitor, did not alter the mitochondrial basal activity (white bar, ns vs. ctrl, dashed line) but inhibited both the insulin and PA-mediated metabolic activation (ns vs. ctrl) (Fig. 4D). Interestingly, rapamycin treatment reversed the PA-induced impairment of the insulin-mediated mitochondrial activity (61.3%, $p < 0.05$) (Fig. 4D), and also impeded mTOR activation by insulin, PA and PA plus insulin, (Fig. 4B). These findings strongly suggest that PA requires mTOR to exert its inhibitory effects on insulin-dependent metabolic activation.

Because the impairment of mitochondrial activity reported previously has only been observed when co-incubating PA and insulin, we wanted to study the effect of inhibiting insulin/PI3K/Akt signaling on this phenomenon. Wortmannin, a specific PI3K inhibitor, did not change the mitochondrial basal activity (white bar, ns vs. ctrl, dashed line), but effectively decreased the insulin-dependent metabolic activation as expected (ns vs. ctrl) (Fig. 4C). In contrast, wortmannin was ineffective at blocking PA-mediated

effects on mitochondrial activation alone or in combination with insulin (52.65%, $p < 0.05$ and 44.3%, $p < 0.05$, respectively) (Fig. 4C). These results showed that insulin, but not PA, requires PI3K activation to modulate metabolic activity and that the PA-induced impairment of the insulin-mediated mitochondrial activity is also dependent, at least in part, on the activation of this kinase.

3.4. PA generates mitochondrial ROS and impairs insulin-mediated mitochondrial metabolism

It has been reported that insulin signaling requires the mitochondrial production of an H_2O_2 transitory pulse in order to promote insulin receptor autophosphorylation, (Mahadev et al., 2001; Pomytkin and Kolesova, 2002; Persiyantseva et al., 2013). On the other hand, it is also known that fatty acid overload can generate an increased mitochondrial ROS, including H_2O_2 (Bonnard et al., 2008; Koves et al., 2008; Anderson et al., 2009). This information led us to hypothesize that an increase in mitochondrial ROS production due to short-term PA treatment could inhibit insulin signaling and that this could explain the impairment of the insulin-induced mitochondrial activity produced by PA. To study this possibility, we analyzed the effect of PA on insulin-mediated metabolic activation in the presence of a specific scavenger of mitochondrial superoxide, mitoTEMPO. In Fig. 5A, we show that the mitochondrial-targeted antioxidant effectively inhibited insulin- but not PA-mediated mitochondrial activity (ns vs. ctrl and 30.53% $p < 0.05$, respectively) and reversed the PA-mediated inhibition of insulin-dependent metabolic activation (33.84%, $p < 0.01$) and Akt phosphorylation (49.8%, $p < 0.05$) (Fig. 5B). However, mitoTEMPO was not effective in reducing the activation of Akt after 15 min of insulin stimulation (94%, $p < 0.01$) (Fig. 5B). These results suggested that insulin signaling requires the generation of a pulse of mitochondrial ROS to induce metabolic activity and that sustained mitochondrial ROS generated by PA treatment for 1 h inhibits insulin signaling and mitochondrial activation.

4. Discussion

The goal of this work was to study the effects of PA on neuronal insulin signaling and alterations in metabolism because, although PA is one of the most abundant saturated fatty acids present in human diets and it has been implicated in the development of insulin resistance in peripheral tissues, its role in insulin sensitivity in neurons has not been extensively studied (Kwon et al., 2014).

The results of this study showed that short-term incubation with PA inhibit the insulin/PI3K/Akt pathway in both differentiated human neuroblastoma cells and rat cortical neurons, measured as a reduction in the phosphorylation of the insulin signaling effectors IRS-1 and Akt. This reduction of the neuronal insulin sensitivity was dose-dependent, which suggested that the effect observed is directly attributable to PA exposure. We also reported that as a result of this PA-mediated insulin resistance, there is a marked decrease in the mitochondrial activation induced by this hormone. We found that the consequences of neuronal exposure to PA on metabolic activity varied with time since we observed a impairment in insulin-mediated mitochondrial activity after short- but not long-term PA exposure. Interestingly, we also found that when incubated with cells for 1 h, PA increases metabolic activity and reduces NAD levels, indicating that PA can activate energy metabolism in neurons in vitro. We did not observe these effects when incubating neurons with PA for 24 h. The latter suggests that PA can be oxidized in the mitochondria and used as metabolic fuel immediately after exposure but that this mechanism gets halted after longer fatty acid exposure. It is known that high concentrations of saturated fatty acids in neuronal mitochondria impair

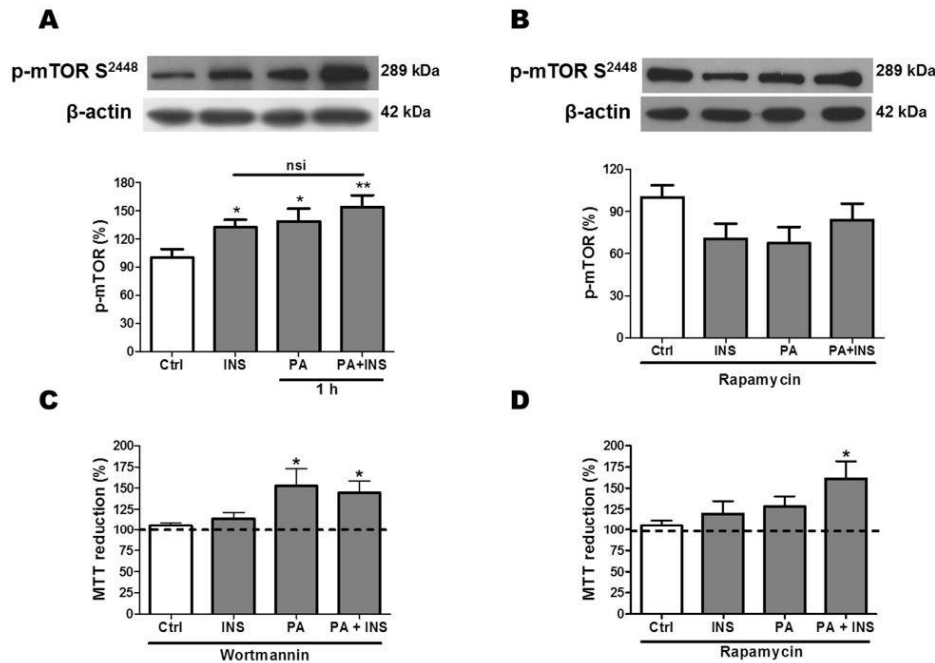


Fig. 4. Effect of insulin and PA on mTOR and PI3K activation. Representative Western-blot and densitometric analysis of phospho-S2448-mTOR (A) from differentiated human neuroblastoma cells exposed 1 h to PA (200 μ M) in the absence or presence of insulin stimulation for 15 min and in the presence of the mTOR inhibitor, rapamycin (B) Mitochondrial activation induced by insulin and PA was evaluated in the presence of wortmannin (C) or rapamycin (D). Graphs represent the comparison between control and cells stimulated 15 min with insulin 10 μ M or for 1 h with PA 200 μ M. Data expressed as the percentage of control values are the mean \pm SEM of duplicate determinations from 4 to 5 independent experiments * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ treatments vs. control.

several processes involved in ATP generation due to electron leaking and mitochondrial ROS production. These phenomena promote oxidative stress and mitochondrial damage that could lead to cellular hypoxia and trigger apoptosis (Schönfeld and Wojtczak, 2008; Schönfeld and Reiser, 2013). Additionally, the blunting in insulin signaling produced by PA exposure could also reduce fatty acid metabolism, as has been thoroughly reported in other cells (Koves et al., 2008).

We found that the metabolic effect of insulin on mitochondrial redox activity was dependent on external glucose. Thus, it is possible that insulin-dependent glucose transporters are being translocated to the neuronal membrane by activation of the insulin/PI3K/Akt pathway, which increases glucose uptake and energy metabolism. In addition, Huang et al. have reported that 1 nM insulin increases mitochondrial inner membrane potential, which correlates with an increase in ATP production, glycolytic flux, and mitochondrial redox potential in cultured neurons (Huang et al., 2005). Moreover, some evidence suggests that neuronal insulin promotes PI3K/Akt-dependent glycolytic activity (Benomar et al., 2006). This conclusion seems to also be supported by the fact that inhibition of PI3K by wortmannin impairs insulin-induced metabolic activity. On the other hand, the PA-mediated effects on mitochondrial metabolism were independent of external glucose, which also supports the idea of neurons using PA as metabolic fuel when exposed to high concentrations of free fatty acids with the resulting metabolic disadvantages (Schönfeld and Reiser, 2013).

To further study the mechanisms behind the impairment of the

insulin-mediated metabolic activation produced by PA, we studied whether PA activates the nutrient-sensor kinase mTOR and its role in PA mitochondrial metabolism. By assessing the phosphorylation state of mTOR, we found that PA activates mTOR, and as expected, so does insulin. Additionally, we found that these compounds do not exert a significant additive effect on mTOR phosphorylation. These results confirm extensive previous reports that insulin activates mTOR through the IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway and also indicate that activation of mTOR by PA occurs downstream of Akt given that PA activates mTOR signaling although IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway is blunted. It is well documented that fatty acids activate mTOR in an Akt-independent fashion through inhibition of AMP-activated kinase (AMPK) (Mordier and Iynedjian, 2007; Wu et al., 2007; Kwon and Querfurth, 2015). According to this mechanism, PA might provide a substrate for β -oxidation, thus increasing ATP production and reducing AMPK activity to increase mTOR activation. Our results support this conclusion and show that PA increases metabolic activity regardless of glucose entry into the cell and that PA reduces NAD levels. Supporting this possibility, it has been shown in hypothalamic neurons that insulin resistance produced by PA requires its mitochondrial metabolism since the non-metabolizable methylpalmitate had no effect and AMPK activation can prevent the deleterious effect of PA on insulin signaling (Mayer and Belsham, 2010).

Interestingly, we found that PA inhibition of the insulin-dependent metabolic activity was reversed when both PI3K and mTOR were inhibited with wortmannin or rapamycin. The first

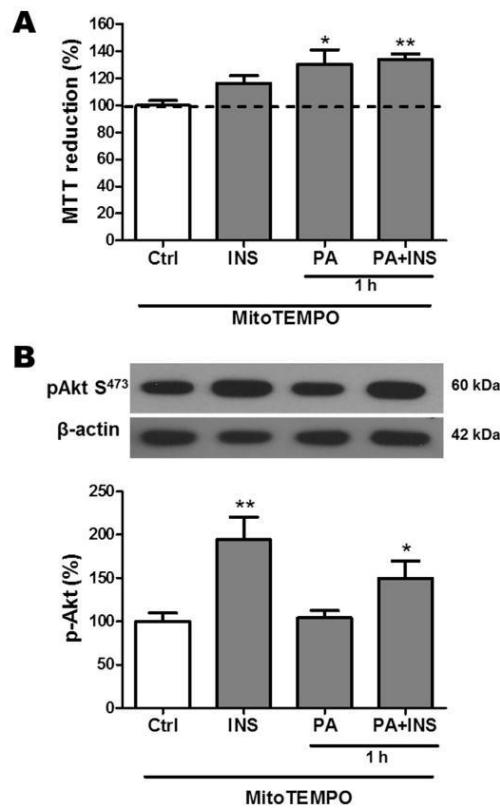


Fig. 5. PA-dependent inhibition of insulin effects is mediated by mitochondrial ROS. Mitochondrial activation was analyzed by MTT reduction in control cells and cells stimulated with insulin, PA or PA plus insulin in the presence of a specific scavenger of mitochondrial superoxide, mitoTEMPO (10 μ M) (A). Basal MTT reduction is indicated by dashed line and control cells in the presence of mitoTEMPO are compared with insulin stimulation, PA or PA plus insulin. Western blot of phospho-S473-Akt in cells incubated with mitoTEMPO in response to insulin stimulation, PA and PA plus insulin (B). Data expressed as the mean percentage \pm SEM of triplicate determinations from 5 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

result was expected since the inhibition of the IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway would abolish insulin effects on mitochondrial activation, leading only to the effects of PA, as observed. On the other hand, the loss of the effect of PA upon mTOR inhibition showed that this kinase is a necessary player in mediating the negative effects of PA on insulin-dependent metabolic activation. This and our previously discussed results suggest that PA exerts its role in insulin resistance through mitochondrial metabolism and activation of mTOR signaling.

The fact that no insulin-mediated mitochondrial activity was found when mTOR was inhibited can be explained since it is widely known that Akt requires a priming phosphorylation by mTOR in order to be activated by the PI3K effector, PDK (phosphoinositide-dependent kinase) (Hresko and Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005; Zeng et al., 2007). With mTOR activity inhibited, the pool of Akt molecules would not have this priming phosphorylation and

therefore would not be able to be activated by insulin.

Finally, we proposed and explored a mechanism by which PA decreases insulin sensitivity and mitochondrial activity in neurons through an increase in mitochondrial ROS production. Indeed, we found that treatment with the mitochondrial-targeted antioxidant, mitoTEMPO, prevented the PA-mediated inhibition of metabolic activation and Akt phosphorylation induced by insulin. In line with this, it has been reported that insulin signaling requires the production of a transitory H_2O_2 pulse signal generated in the mitochondria that must exceed a certain threshold to efficiently sustain insulin receptor autophosphorylation (Schmid et al., 1998, 1999; Mahadev et al., 2001; Pomytkin and Kolesova, 2002, 2003; Goldstein et al., 2005; Storozhevych et al., 2007; Persiyantseva et al., 2013). However, it is very important to mention that an excess of mitochondrial ROS production impairs insulin signaling (Goldstein et al., 2005; Anderson et al., 2009). On the other hand, we showed that PA is metabolized in neurons, and others have shown that fatty acids metabolism produces mitochondrial ROS, including H_2O_2 (Bonnard et al., 2008; Kovcs et al., 2008; Anderson et al., 2009). Additionally, it has been reported that an acute increase in mitochondrial H_2O_2 temporarily overwhelms the mitochondrial antioxidant capacity and could lead to electron leaks and mitochondrial uncoupling (Korshunov et al., 1997; Liu, 1999; Tretter and Adam-Vizi, 2000; Evans et al., 2005; Anderson et al., 2009; Moser et al., 2009). In regard to our experimental model, it is worth mentioning that the MTT reduction assay used for measuring the mitochondrial activation that occurs mostly via complex II, or succinate dehydrogenase, which is the same enzyme responsible for the H_2O_2 pulse generation after insulin stimulation (Slater et al., 1963; Musser and Oseroff, 1994; Takahashi et al., 2002).

In conclusion, we propose the following model for a diminished neuronal insulin sensitivity and insulin-mediated mitochondrial activation caused by PA administration: 1) PA administration for 1 h activates mitochondrial metabolism and mTOR, which leads to increased mitochondrial ROS production, including H_2O_2 . 2) Under these conditions, when neurons are challenged with insulin, an additional mitochondrial H_2O_2 pulse is generated by the succinate dehydrogenase. We propose that the mitochondrial pro-oxidant state promoted by AP metabolism would increase the amplitude and duration of this insulin-dependent H_2O_2 pulse. 3) This increase in mitochondrial ROS would have two consequences: first, it would blunt insulin signaling at the level of insulin receptor autophosphorylation, leading to a decrease in glucose uptake and metabolism; second, it would also decrease succinate dehydrogenase activity, leading to diminished mitochondrial metabolism.

This work provides novel evidence of the mechanisms behind saturated fatty acid-induced insulin resistance and its metabolic consequences in non-hypothalamic neurons.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA, PAPIIT IN202615. K Sánchez-Alegría is supported by CONACYT, 597751.

The authors declare there are no conflicts of interest.

References

- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C.T., et al., 2009. Mitochondrial H_2O_2 emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 119, 573–581. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI37048>.
- Benomar, Y., Naour, N., Aubourg, A., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., Guerre-Millo, M., Taouis, M., 2006. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology* 147, 2550–2556. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1464>.
- Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S.,

- Lefevre, A.L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., Niswender, K., Irani, B.G., Holland, W.L., Clegg, D.J., 2009. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 2577–2589. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI36714>.
- Biessels, G.J., Reagan, L.P., 2015. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 660–671. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn4019>.
- Bingham, E.M., Hopkins, D., Smith, D., Pernet, A., Hallett, W., Reed, L., Marsden, P.K., Amiel, S.A., 2002. The role of insulin in human brain glucose metabolism: an 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography study. *Diabetes* 51, 3384–3390. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.12.3384>.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chansaume, E., Chauvin, M.A., Morio, B., et al., 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 118, 789–800. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32601>.
- Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S., Arias, C., 2014. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 34, 1001–1008. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>.
- Calvo-Ochoa, E., Arias, C., 2015. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 31, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2531>.
- Clore, J.N., Allred, J., White, D., Li, J., Stillman, J., 2002. The role of plasma fatty acid composition in endogenous glucose production in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 51, 1471–1477. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.35202>.
- Craft, S., 2007. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 147–152. <http://dx.doi.org/10.2174/156720507780362137>.
- Evans, J.L., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., 2005. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal* 7, 1040–1052. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1040>.
- Goldstein, B.J., Mahadev, K., Wu, X., 2005. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 54, 311–321. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.311>.
- Gralle, M., 2017. The neuronal insulin receptor in its environment. *J. Neurochem.* 140, 359–367. <http://dx.doi.org/10.1111/jnci.13909>.
- Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., Bhansali, A., 2013. Diabetes mellitus and risk of dementia: a meta-analysis of prospective observational studies. *J. Diabetes Invest.* 4, 640–650. <http://dx.doi.org/10.1111/jdi.12087>.
- Hoscheidt, S.M., Starks, E.J., Oh, J.M., Zetterberg, H., Blennow, K., Krause, R.A., Gleason, C.E., Pugliesi, L., Atwood, C.S., Carlsson, C.M., Asthana, S., Johnson, S.C., Bendlin, B.B., 2016. Insulin resistance is associated with increased levels of cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease pathology and reduced memory function in at-risk healthy middle-aged adults. *J. Alzheimers Dis.* 52, 1373–1383. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-160110>.
- Hresko, R.C., Mueckler, M., 2005. mTOR/RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 40406–40416. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M508361200>.
- Huang, T.J., Verkhatsky, A., Femyhough, P., 2005. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 28, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.08.009>.
- Ishii, M., Maeda, A., Tani, S., Akagawa, M., 2015. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of the insulin signaling molecules. *Arch. Biochem. Biophys.* 566, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jabb.2014.12.009>.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9).
- Koves, T.R., Ussher, J.R., Noland, R.C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., et al., 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 7, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>.
- Kurotani, K., Sato, M., Ejima, Y., Nanri, A., Yi, S., Pham, N.M., Akter, S., Poudel-Tandukar, K., Kimura, Y., Imaizumi, K., Mizoue, T., 2012. High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr. Res.* 32, 669–675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.004>.
- Kwon, B., Lee, H.K., Querfurth, H.W., 2014. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1402–1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbhamc.2014.04.004>.
- Kwon, B., Querfurth, H.W., 2015. Palmitate activates mTOR/p70S6K through AMPK inhibition and hypophosphorylation of raptor in skeletal muscle cells: reversal by oleate is similar to metformin. *Biochimie* 118, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.009>.
- Lee, J.Y., Cho, H.K., Kwon, Y.H., 2010. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism* 59, 927–934. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.10.012>.
- Liu, S.S., 1999. Cooperation of a "reactive oxygen cycle" with the Q cycle and the proton cycle in the respiratory chain-superoxide generating and cycling mechanisms in mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 314, 367–376. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018650103259>.
- Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L., Goldstein, B.J., 2001. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 21938–21942. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100109200>.
- Matsuzaki, T., Sasaki, K., Tanizaki, Y., et al., 2010. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease the Hisayama study. *Neurology* 75, 764–770. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181eee251>.
- Mayer, C.M., Belsham, D.D., 2010. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151, 576–585. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1122>.
- Mordier, S., Linedjian, P.B., 2007. Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 and insulin resistance induced by palmitate in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.004>.
- Moser, M.D., Matsuzaki, S., Humphries, K.M., 2009. Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 488, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jabb.2009.06.009>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Musser, D.A., Oseroff, A.R., 1994. The use of tetrazolium salts to determine sites of damage to the mitochondrial electron transport chain in intact cells following in vitro photodynamic therapy with Photofrin II. *Photochem. Photobiol.* 59, 621–626. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097>.
- Oh, H., Boghossian, S., York, D.A., Park-York, M., 2013. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Res.* 1537, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.025>.
- Ono, H., Poci, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, J.M., Schwartz, G.J., Rossetti, L., 2008. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet induced hepatic insulin resistance in rats. *J. Clin. Invest.* 118, 2959–2968. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI34277>.
- Parker, S.M., Moore, P.C., Johnson, L.M., Poitout, V., 2003. Palmitate potentiation of glucose-induced insulin release: a study using 2-bromopalmitate. *Metabolism* 52, 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00279-8](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00279-8).
- Persiyantseva, N.A., Storozhevych, T.P., Senilova, Y.E., Gorbacheva, L.R., Pnelis, V.G., Pomytkin, I.A., 2013. Mitochondrial H2O2 as an enable signal for triggering autophosphorylation of insulin receptor in neurons. *J. Mol. Signal* 8, 11. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-2187-8-11>.
- Pomytkin, I.A., Kolesova, O.E., 2002. Key role of succinate dehydrogenase in insulin-induced inactivation of protein tyrosine phosphatases. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1336, 568–570. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020229724717>.
- Pomytkin, I.A., Kolesova, O.E., 2003. Effect of insulin on the rate of hydrogen peroxide generation in mitochondria. *Bull. Exp. Biol. Med.* 1356, 541–552. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025412915297>.
- Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., et al., 2009. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1003–E1012. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90377.2008>.
- Reynolds, C.P., Biedler, J.L., Spengler, B.A., et al., 1986. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 375–387. <https://doi.org/10.1093/jnci/76.3.375>.
- Sarbasov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1106148>.
- Schrijvers, E.M.C., Witteman, J.C.M., Sijbrands, E.J.G., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M.B., 2010. Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease the rotterdam study. *Neurology* 75, 1982–1987. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181fe4f6>.
- Schmid, E., El Benna, J., Galter, D., Klein, G., Droge, W., 1998. Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB J.* 12, 863–870.
- Schmid, E., Hotz-Wagenblatt, A., Hacı, V., Droge, W., 1999. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural basis of redox priming. *FASEB J.* 13, 1491–1500.
- Shiple, M.M., Mangold, C.A., Szpara, M.L., 2016. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J. Vis. Exp.* 108, 53193. <http://dx.doi.org/10.3791/53193>.
- Schönfeld, P., Wojtczak, L., 2008. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 231–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029>.
- Schönfeld, P., Reiser, G., 2013. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 10, 1493–1499. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>.
- Sima, A.A.F., 2010. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 47, 279–293. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-010-0218-0>.
- Slater, T.F., Sawyer, B., Strauli, U., 1963. Studies on succinate-tetrazolium salt. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 383–393. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)90513-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)90513-4).
- Storozhevych, T.P., Senilova, Y.E., Persiyantseva, N.A., Pnelis, V.G., Pomytkin, I.A.,

2007. Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci.* 8, 84. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-8-84>.
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J., Fukuuchi, Y., 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem. Int.* 40, 441–448. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00097-3).
- Tremblay, F., Brule, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X.J., Krebs, M., Polakiewicz, R.D., Thomas, G., Marette, A., 2007. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14056–14061. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0706517104>.
- Tretter, L., Adam-Vizi, V., 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J. Neurosci.* 20, 8972–8979.
- Umegaki, H., 2010. Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 39, 8–10. <https://doi.org/10.1093/ageing/afp211>.
- Viscogliosi, G., Andreozzi, P., Chiriac, I.M., et al., 2012. Screening cognition in the elderly with metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 10, 358–362. <http://dx.doi.org/10.1089/met.2012.0043>.
- Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., Mendelsohn, F.A., 1989. Localization and characterization of insulin-receptors in rat-brain and pituitary-gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 1, 369–367. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1562>.
- Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., Zou, M.H., 2007. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 282, 9777–9788. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608310200>.
- Zeng, Z., Sarbasov dos, D., Samudio, I.J., Yee, K.W., Munsell, M.F., Ellen Jackson, C., et al., 2007. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109, 3509–3512. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030833>.
- Zhao, W.Q., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M.J., Alkon, D.L., 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 274, 34893–34902. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893>.

2. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions



Review

PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions

Karina Sánchez-Alegría [†], Manuel Flores-León [†], Evangelina Avila-Muñoz,
Nelly Rodríguez-Corona and Clorinda Arias ^{*†}

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, DF, Mexico; k.aisa.62@hotmail.com (K.S.-A.); manuel.leoncio75@gmail.com (M.F.-L.); avmueva@gmail.com (E.A.-M.); rodriguezcorona.nelly@gmail.com (N.R.-C.)

* Correspondence: carias@unam.mx; Tel.: +52-55-5622-9215; Fax: +52-55-5622-9182

[†] These two authors contributed equally to this work.

Received: 19 October 2018; Accepted: 15 November 2018; Published: 23 November 2018



Abstract: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling contributes to a variety of processes, mediating many aspects of cellular function, including nutrient uptake, anabolic reactions, cell growth, proliferation, and survival. Less is known regarding its critical role in neuronal physiology, neuronal metabolism, tissue homeostasis, and the control of gene expression in the central nervous system in healthy and diseased states. The aim of the present work is to review cumulative evidence regarding the participation of PI3K pathways in neuronal function, focusing on their role in neuronal metabolism and transcriptional regulation of genes involved in neuronal maintenance and plasticity or on the expression of pathological hallmarks associated with neurodegeneration.

Keywords: PI3K signaling; neurodegeneration; neuronal metabolism; gene expression; neuroinflammation

1. Introduction

Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are a family of multifaceted enzymes that play a central role in diverse metabolic processes that regulate many aspects of cell physiology. PI3Ks are evolutionarily conserved enzymes that transduce mitogenic and metabolic signals to promote cell growth, proliferation, migration, and apoptosis [1–3]. PI3Ks belong to a family of lipid kinases that comprise eight isoforms that have been classified according to their substrate specificity and structural features into three classes: I, II, and III [1–4]. The most studied family is class I, which catalyzes the conversion of phosphatidylinositol into 3'-phosphoinositides (PtdIns-3P), while class II PI3Ks, which consist of a single catalytic subunit, prefer PtdIns-4P and PtdIns-3,4P as substrates, similar to class III PI3Ks, which are additionally involved in vesicular trafficking, secretion, and autophagy [5–7].

Class I PI3Ks form a functional heterodimer composed of two subunits, one catalytic and one regulatory, with molecular weights of 110 kDa (p110) and 85 kDa (p85), respectively. The catalytic p110 subunit also has four different isoforms (α , β , γ , and δ , also known as PI3KCA, PI3KCB, PI3KCG, and PI3KCD, respectively), and the most frequent regulatory p85 subunit encoded by three different genes (α , β , and γ) [8]. Most neurons in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum express both the catalytic p110 α and all the regulatory p85 subunits at high levels [9,10]. PI3K activates protein kinase B (PKB), also known as AKT, which in turn activates mTOR. Particularly in the brain regions aforementioned, activation of the AKT/mTOR pathway seems to be essential for neuronal development and synapse formation [11–14] and contributes to neuronal plasticity and memory performance [15–18]. The activation of this pathway through receptor tyrosine kinase (RTK) by growth factors constitute the core path that regulates neuronal proliferation, maturation, and integration

into mature circuits in the brain [19]. The important function of PI3K in neurons has also been demonstrated for its involvement in severe brain pathologies, such as developmentally-associated brain malformations [20,21], epilepsy [22,23], aging-associated neurodegeneration [24–26], and brain cancer [27,28].

Different combinations of PI3K isoforms may result in different functional events depending on the metabolic context, upstream signals, and interconnection of different cellular pathways. For example, in sensory neurons, p110 δ is an important signaling component for efficient axonal elongation in the developing and regenerating nervous system [29]. In this sense, the inactivation of the p110 δ produces deficient axonal elongation and prevents axonal regeneration in a model of sciatic nerve crush injury [29]. The manipulation of PI3K/AKT signaling has been proven to induce dramatic changes in myelination. In a conditional knockout for PTEN, the phosphatase that reduces the activation of PI3K/AKT, a hypermyelination phenotype is associated with an increase in PtdIns-3P and AKT activation [30]. It has also been confirmed that the increased synthesis of the p110 β subunit of PI3K contributes to the anatomical, behavioral, and molecular defects associated with fragile X syndrome [31]. Accordingly, many studies have demonstrated that the activation of PI3K induces cell proliferation, and overexpression of the p85 regulatory subunit inhibits PI3K/AKT signals, impairs neuronal stem cell proliferation, and disturbs neuronal differentiation during the development of mouse cerebral cortex [32]. PI3K dysregulation also plays a significant role in glioblastoma pathogenesis. Pharmacological inhibition of the catalytic subunits p110 β and p110 α but not p110 δ has impaired glioblastoma growth and caused tumor regression in *in vivo* models [33]. On the other hand, increased PI3K/AKT/mTOR signaling was identified in several human brain samples, strongly implicating this pathway in diverse cases of hemimegalencephaly, a developmental disorder characterized by brain overgrowth dependent on the increased number of neurons and glial cells [34].

All of these studies indicate that PI3K/AKT is a central node that integrates developmental signals that are necessary for brain development, maintenance, repair, and plasticity during adult life.

2. PI3K Signaling in Neuronal Metabolism

PI3K signaling associated with metabolism has been mainly in the hypothalamus, a region that regulates energy balance and glucose homeostasis. Clear implications point to the role of class I PI3K in energy balance in hypothalamic neurons. PI3K/AKT activation by insulin inhibits glucose production in the liver through the activation of ATP-dependent K⁺ channels in the hypothalamus [35–38]. In fact, the infusion of insulin and the consequent activation of the PI3K pathway is able to suppress glucose production independently of circulating insulin. Recently, it has been shown that different PI3K catalytic subunits are involved in differential responses of hypothalamic neurons by insulin or leptin. For example, while neuronal hyperpolarization induced by insulin and leptin depends on both p110 α and p110 β PI3K catalytic subunits, the depolarization effect of leptin depends solely upon the PI3K 110 β subunit [39]. These differences affect the regulation of energy balance and glucose homeostasis. PI3K/AKT pathway also contributes to glucose uptake and energy metabolism through the regulation of GLUT3 transporter expression, as well as the expression of the glycolytic enzyme phosphofructokinase-1 (PFK-1) during differentiation of cortical neurons [40]. It has been shown that neuronal glucose uptake is not dependent upon insulin/PI3K/AKT signaling; however, after high neuronal activity, the insulin/PI3K/AKT pathway induces GLUT4 translocation to the membrane to increase glucose transport in hippocampal neurons and improve cognitive functioning [41]. Accordingly, insulin administration improves memory task performance. This positive effect on cognition is completely mediated by PI3K activation and the increase in local glucose metabolism [42]. Thus, the insulin/PI3K/AKT/mTOR pathway importantly modulates neuronal plasticity underlying high cognitive functions. In fact, it was recently reported that AKT3 knockout mice exhibit microcephaly, cognitive defects, and reduced protein synthesis in response to long-term potentiation (LTP) via inactivation of mTOR and reduced protein synthesis necessary to sustain plasticity changes [43]. Different isoforms of PI3K have been implicated in

synaptic plasticity and cognitive functions. Genetic deletion or overexpression of PI3K γ disrupts long-term depression (LTD) and reduces spatial learning tasks, while contextual fear memory is not affected [44,45]. Similarly, activation of PI3K in the amygdala was found to be associated with fear conditioning [46].

Dysregulated PI3K/AKT signaling in neurons has several harmful consequences, such as elevated ROS levels, membrane depolarization, mitochondrial fragmentation, and decreased oxidative phosphorylation and ATP production [47–50]. It is particularly interesting that the amyloid peptide involved in Alzheimer's disease (AD) is capable of producing sustained activation of AKT, which in turn phosphorylates the mitochondrial fission protein Drp1. This mechanism has been proposed to be involved in the mitochondrial fragmentation observed in this neurodegenerative disease [47–50] (Figure 1).

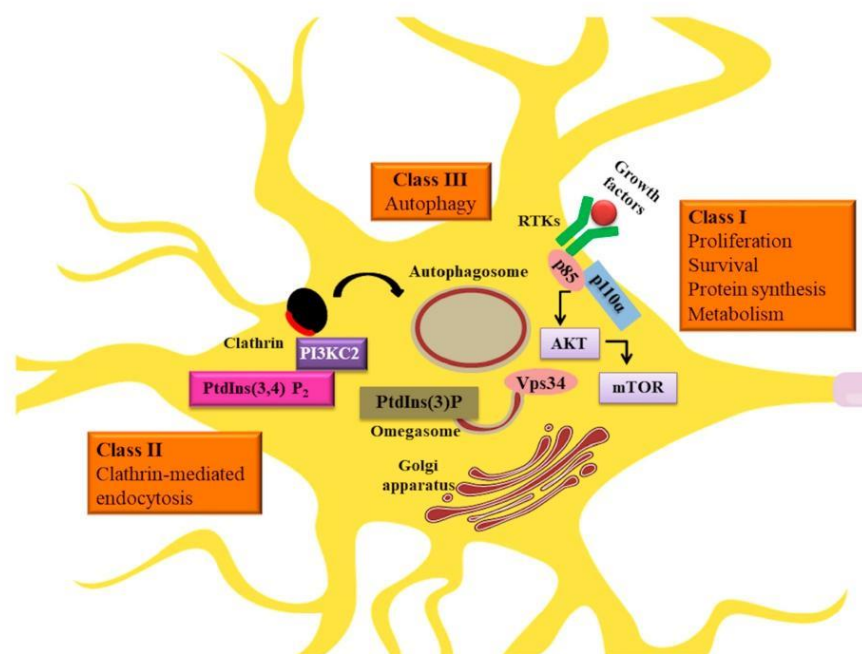


Figure 1. Involvement of different phosphoinositide 3-kinase (PI3K) classes in neuronal function. Class I acting through receptor tyrosine kinase (RTK) pathways mediate survival, proliferation, protein synthesis, and metabolism. Class II participates in vesicular trafficking and class III in autophagy.

3. The Role of PI3K in Neuroinflammation

Inflammation is recognized as a central player in a variety of brain diseases. An exacerbated inflammatory response has been associated with some chronic neuropathological conditions, such as AD [51–56]. There is evidence at the systemic level that PI3K induces the activation of NF- κ B and, specifically, class I PI3Ks are involved in the transduction pathway of toll-like receptors (TLRs) in immune cells, such as macrophages and dendritic cells. However, in regard to the role of activation of different isoforms of the class I PI3Ks, the results have suggested that they can play either positive or negative roles in the production of pro-inflammatory cytokines [57]. It has been shown that the activation of TLRs can induce the recruitment of class I α PI3Ks, which leads to downregulation in NF- κ B-induced pro-inflammatory cytokines in macrophages [57]. On the other hand, loss of functional

PI3K δ reduces TLR4 internalization and relocation to endosomes, promoting the early secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-12) and reducing the secretion of anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) and interferon- β (IFN- β) in dendritic cells [58]. Additionally, it has been shown in vitro and in vivo that PI3K γ plays an important role in the initial signal transduction events downstream of chemoattractant and chemokine G protein-coupled receptors (receptors for fMLP, C5a, IL-8, LTB4) that promote the extravasation and migration of innate immune cells, such as neutrophils, monocytes, or eosinophil, during inflammation [51,59–66].

In the central nervous system (CNS), microglial cells are resident macrophages involved in immunological responses. Excessive microglia activation may lead to synaptic loss and neuronal dysfunction. It has been shown that the activation of AKT precedes NF- κ B-dependent transcription of proinflammatory genes in activated microglia. In this report, the authors found that LPS is able to activate PI3K/AKT through the stimulation of TLR4 [67]. Moreover, using different natural compounds, it has been suggested that PI3Ks are involved in the development of the neuroinflammatory response modulating the release of cytokines. For example, studies in LPS-stimulated microglial cells demonstrated that curcumin attenuates the expression of TNF- α , IL-6, and IL-1 β through the suppression of PI3K/AKT-mediated activities [68,69]. Additionally, the flavonoid compound morin exerts anti-inflammatory effects by downregulating MAPK and PI3K/AKT signaling pathways and upregulating the anti-inflammatory PKA/CREB and Nrf2/HO-1 pathways in microglia [70]. Furthermore, it has been shown that TGF-1 β , an anti-inflammatory molecule, protects brain tissue by repressing the overactivation of microglial cells via inhibition of PI3K and its downstream signaling molecules [71]. Remarkably, not only are glial cells involved in neuroinflammation, but hippocampal neurons can also contribute to neuroinflammation by releasing TNF- α and IL-1 β via TLR4-mediated PI3K/AKT/NF- κ B signaling [72].

Chronic inflammation in the brain is a feature of some neurological disorders associated with neuronal damage. Therefore, pharmacological-based therapies focusing on PI3K signaling is a promising research avenue. For example, in an injury model of cerebral ischemia/reperfusion, the use of a class I PI3K inhibitor (ZSTK474) was able to alleviate neurological deficits and reduce the infarct volume. This therapeutic benefit was associated with the induction of an anti-inflammatory phenotype in microglia leading to a decrease in secreted pro-inflammatory molecules through the PI3K/AKT/mTORC1 pathway [73].

In another model of brain injury due to a surgical procedure (SBI), it has been demonstrated that PI3K γ promotes a pro-inflammatory phenotype. Furthermore, pharmacological inhibitors of PI3K γ (AS252424 or AS605240) improve neurological function after SBI [74]. Interestingly, chronic neuroinflammation has been associated with the development of AD [53–56] and a variety of inflammatory intermediaries, including IL-1 β , IL-6, and TNF- α , have been found to be upregulated in this disease [51,52,54,55]. Epidemiological studies indicate that anti-inflammatory agents, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have a beneficial effect on AD, and several reports have shown that NSAIDs protect against inflammation in transgenic AD models [56]. It has been shown that some NSAIDs can exert their actions by modulating PI3K [75–77]. Thus, an interesting line of investigation is now directed at analyzing the relationship between inflammation, PI3K signaling, and AD.

4. Genetic and Epigenetic Regulation through the PI3K/AKT Signaling Pathway

One of the main processes that control the genetic programming and functions of neurons is the recruitment and activation of transcription factors and chromatin remodeling complexes in response to specific intrinsic demands and upstream signals. PI3K, through AKT activation, enhances the interaction and activity of several transcription complexes composed of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors (Neurogenin, NeuroD1, and MASH1), acetyltransferases (HATs), such as CBP and p300, and histone deacetylases (HDACs) [78].

In vitro experiments demonstrate that AKT activation by the natural flavonoid curcumin in combination with an inhibitor of HDACs improves neuronal survival and restores neuronal damage induced by amyloid beta ($A\beta$), which is a peptide associated with AD [79]. One of the proposed mechanisms for such protection is the AKT-dependent phosphorylation of the transcription factor CREB, which in turn promotes the expression of the brain-derived neurotrophic factor gene *bdnf*. Neuronal survival also seems to be dependent on PI3K/AKT signaling through regulation of the NF- κ B transcription factor at two levels: through enhancing the activity of the inhibitory kinase IKK and by directly phosphorylating NF- κ B, which increases its activity [80,81].

Experiments in PC12 cells strongly suggest that PI3K/AKT is the signaling pathway responsible for the activation of late phase gene expression involved in neuronal differentiation, neurogenesis, and neuroprotection [82]. Interestingly, nerve growth factor (NGF)-dependent PI3K/AKT/NF- κ B signaling is also associated with an epigenetic modification at lysine 9 of histone 3 (H3K9) during neuronal differentiation through the expression of the G protein-coupled delta opioid receptor gene *dor* [83].

Forkhead transcription factors (FOXO) are a family of proteins that play important roles in regulating the expression of genes involved in cell growth, apoptosis, and longevity. When AKT phosphorylates FOXO, it is translocated from the nucleus to the cytosol as an inactive complex, inhibiting transcription of the tumor suppressor p53 and preventing apoptosis, as previously demonstrated in hippocampal neurons after hypoxia [84]. Interestingly, PI3K/AKT signaling is inhibited in neuronal cultures exposed to the $A\beta$ peptide, which induces the translocation of FOXO from the cytosol to the nucleus and the expression of the proapoptotic protein BIM [85]. Recent results have suggested that the neuroprotective effect of the mood stabilizer valproic acid is mediated through the inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and the activation of PI3K/AKT signaling. Valproic acid is one of the best known epi-drugs and acts as a pan-inhibitor of HDACs that are associated with chromatin remodeling and transcriptional activation of neuroprotective genes, such as fibroblast growth factor (*FGF-21*) mRNA [86].

The balance between acetylation and deacetylation is crucial for the regulation of gene expression in physiological and pathological conditions. Both epigenetic processes are altered during aging and in some neuropathological conditions, such as AD. Studies in primary neuronal cultures and in vivo mouse models of AD at different stages have revealed increased global levels of acetylated histones H3 and H4 [87]. The hyperacetylated state of H3 and H4 was also observed in post-mortem brains of AD patients, especially in the most affected regions, such as the inferior and middle temporal gyrus [88]. Since acetylated histones are associated with open states of the chromatin that allow gene transcription, several genes that play an important role in the progression of AD markers can be upregulated when chromatin is hyperacetylated. One of these genes is the *Bace1* gene for the β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). Upregulation of BACE1 mRNA associated with hyperacetylation in the promoter region of *Bace1* has been reported in the 3xTg-AD mouse model [89,90]. Furthermore, in vitro experiments have demonstrated that this hyperacetylation is associated with a hyperactivated state of the acetyltransferase p300 that not only modifies histones but can recruit transcription factors such as CREB and NF- κ B [90].

In addition to acetylation, histones can be mono-, di-, or trimethylated on lysine or arginine residues. However, less is known about how PI3K/AKT can regulate these posttranslational modifications. It has been shown that the polycomb repressive complex 2 is responsible for establishing this epigenetic mark through the methyltransferase enhancer Zeste 2 (EZH2). EZH2 can be regulated by AKT phosphorylation, which reduces its activity and, therefore, the amount of H3K27me3 in the genome [91]. Interestingly, the reduction of this epigenetic marker is associated with the activation of several genes involved in memory, cognition, cell survival, and axonal growth [91,92].

Because epigenetic mechanisms are dynamic and constantly changing, it is not surprising that PI3K/AKT signaling activation in response to growth factors can modulate some of the eraser proteins, such as histone demethylases (KDMs). The phosphorylation induced by AKT promotes the exit of KDM5A from the nucleus and the increase in H3K4me3 content associated with active transcription in specific promoters [91]. Interestingly, it has been shown that brains affected by AD aberrantly accumulate H3K4me3 in the neuronal cytoplasm. This accumulation is associated with the progression of AD-related pathological hallmarks, making a positive correlation as the pathology worsens [93]. These studies suggest that the role of PI3K/AKT participation in AD modifies the transcription of genes related to neuronal function and survival through changes in epigenetic markers.

DNA methyltransferases (DNMTs) are enzymes that are responsible for the addition of a methyl group to the C5 cytosine residue to produce 5-methylcytosine (5mC). During the development of neural stem cells (NSCs), inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway enhances the expression of DNMT1 and DNMT3a and turns off the transcription of genes in a concerted manner through differentiation and maturation processes [94]. PI3K/AKT signaling also induces upregulation of the activity of the TET enzymes producing active DNA demethylation. This activation allows differentiation genes, such as the *Ng2*, to be activated and promotes neuronal stem cell (NSC) commitment to the neural lineage [94].

The regulation of DNA methylation and demethylation processes needs to be tightly controlled through adulthood. Recent studies in the AD model 5xFAD report that DNA methylation is increased when A β begins to accumulate and this increase is accompanied by the upregulation of DNMTs [95]. Nevertheless, it is not surprising that different studies report different findings when analyzing post-mortem brains of patients diagnosed with AD. One of the first groups that studied these markers in human brains reported a global decrease in 5mC and 5hmC in the hippocampus, particularly in the CA1 region and the dentate gyrus [96]. However, another study reported hypermethylation of autosomal differentially methylated regions that also contained altered histone methylation markers [97]. More specifically, the promoters of genes associated with plasticity, such as BDNF, have been found to have high levels of methylation in patients with AD, which also correlates with a reduction in the mRNA or protein levels of BDNF [98]. The authors of the respective manuscripts discuss that the differences in their findings might be due to the nature of either the genetic background of the transgenic mice or the stage of AD in patients upon death. They further discuss that, at least in transgenic mice, when they compared aged mice to young mice, they found that the levels of epigenetic markers are upregulated. Nevertheless, the findings demonstrate that the regulation of the methylation/demethylation of DNA is affected by aging and AD. Another possibility to be considered is the particular state of PI3K/AKT activation and the levels of growth factors that are able to activate this signaling pathway.

Altogether, this evidence points to the important role of PI3K/AKT signaling in the regulation of gene transcription in the brain throughout life in healthy and diseased states. Although this pathway does not directly impact chromatin, it regulates several transcription factors and chromatin remodeling proteins and complexes that can alter the balance between heterochromatin and euchromatin. Furthermore, whenever this signaling pathway is altered, as in aging or AD, aberrant epigenetic signatures appear that deregulate gene expression, which eventually leads to neurodegeneration (Figure 2).

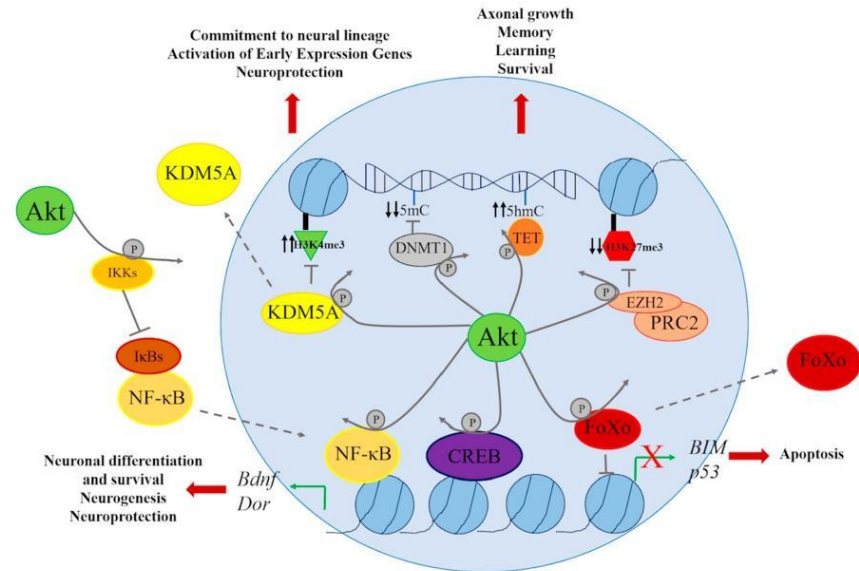


Figure 2. AKT phosphorylates several transcription factors, including NF-κB, CREB, and FOXO, implicated in the transcription of genes regulating neuronal differentiation, neuroprotection, neurogenesis, and apoptosis, such as Bdnf, Dor, BIM, and p53. PI3K stimulation can also inhibit (KDM5A, DNMT1, and EHZ2) or activate (TET) chromatin-associated proteins leading to upregulation or repression of genes implicated in neural differentiation, axonal growth, memory, and learning through altering chromatin marks in histone tails of DNA modifications.

5. Vesicle Recycling and Neurotransmission

In addition to the significant role of class I PI3Ks in the brain and the vast knowledge around this family of PI3K, less is known about the important role of the class II and class III PI3Ks. The action of the two class II PI3Ks (PI3K-C2 α , β) has been implicated in clathrin-mediated endocytosis, glucose transport, insulin secretion, neurosecretory granule release, muscle contraction, and cell migration [99]. At present, there is no clear evidence that class II PI3Ks are involved in AKT activation, although PI3K-C2 β becomes activated by some growth factors, such as epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF), associated with RTKs [100]. Class II and III PI3Ks catalyze the conversion of PtdIns to PtdIns3P, which is a major constituent of endosomal membranes. PtdIns3P is an intracellular second messenger and a hallmark of many signaling pathways controlling proliferation, growth, invasion, and vesicle trafficking [101]. Distinctively, vesicle trafficking encompasses communication between endosomal compartments, which can assist in signaling transduction and act as integrators and processors. Moreover, recycling and retrieval of soluble or membrane-embedded protein cargos from the endosome to the trans-Golgi network or the plasma membrane determine the concentration of important molecules at the cell surface. Therefore, fine regulation of endosomal protein sorting and trafficking must occur to maintain neuronal homeostasis, synapse formation [102], or avoidance of neurodegeneration [103,104]. Although the role of class II PI3Ks in endocytic vesicle recycling is relevant, there are few studies on how the function of class II PI3Ks may impact neurotransmission in the nervous system. PI3K-C2 α is present in clathrin-coated vesicles of isolated brains [105] and binds to clathrin-mediated vesicles, which locally produce phosphoinositide in growing clathrin-coated pits [106]. In PC12 cells, activation of PI3K-C2 α enhances the exocytosis of neurosecretory granules, whereas transfection of PC12 cells with

a catalytically inactive PI3K-C2 α inhibits this process [107]. Remarkably, PI3KC2 α not only participates in the exocytosis of neurosecretory granules but also in the exocytosis of cargos transported from the trans-Golgi network, such as delta opioid receptor (δ R), which requires PI3KC2 α for surface trafficking. Inhibition of PI3Ks with wortmannin causes the retention of δ R at the Golgi complex, as shown by immunofluorescence colocalization of TGN-38 (a trans-Golgi network marker) and (GFP)- δ R [108] (Figure 3). On the other hand, phosphoinositides generated by class II PI3K and class III PI3K in *Drosophila* are necessary for the rapid appearance and long-term maintenance of pre-synaptic homeostatic potentiation through the enhancement of presynaptic vesicle recycling in *Drosophila* [109]. The class II PI3K homologous gene mutant disrupts the generation of PtdIns3P, which determines the early endosomal membrane required for the recruitment of Rab11 to recycling endosomes. Similarly, class III PI3K orthologue Vps34 and postsynaptic Rab11 knockdown also block the expression of trans-synaptic potentiation, demonstrating a new post-synaptic signaling depending on the formation of PtdIns3P by class II and III PI3Ks [109].

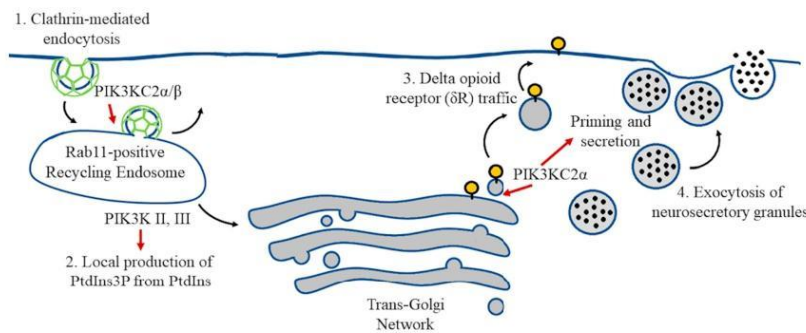


Figure 3. PI3KC2 α and β are associated with clathrin-coated endocytic intermediates (1.) while PI3K II and III participate in the local production of PtdIns3P at recycling endosomes (2.). PI3KC2 α regulates priming and secretion of large dense core vesicles at chromaffin cells (3.) and PI3KC2 α is required for Delta opioid receptor (δ R) trafficking [4].

6. Class III PI3Ks in Neuronal Autophagy

The class III PI3Ks mainly control the trafficking of intracellular vesicles in the context of autophagy, endocytosis, and phagocytosis. The Beclin 1-Vps34 complex is a core component of class III PI3Ks, and binds Atg14L or UVRAG to control different steps of autophagy in mammalian cells. It is not clear which extracellular stimuli are able to activate this complex although some evidence points to the role of nutrients such as glucose and amino acids [110]. The Beclin 1-Vps34 complex is essential for mouse development and viability [111]. Autophagy and endosomal processes are essential for maintaining neuronal stability [112,113]. In a recent study, it was reported that class III PI3K-deficient mice abnormally accumulate protein aggregates, vacuoles, and endosomes in large diameter sensory neurons and induce neurodegeneration [111]. Class III PI3K also mediates the endosome-lysosome degradation to promote axon pruning during development [114]. However, it must be mentioned that autophagy is a complex mechanism that also implicates regulation by PI3K/AKT/mTOR signaling.

7. Conclusions

PI3K-mediated signaling is a central node that coordinates a variety of complex events that lead to changes in neuronal development, growth, energy metabolism, and survival. All these functions are carried out through the integration of upstream signals and the downstream control of gene expression. The complexities of function require further studies to better understand the specific

regulation of different PI3K enzymes in different metabolic contexts that may have implications in neuronal physiology in healthy and diseased states. These studies will allow for future advances in the understanding of how PI3K signaling is designed and implemented at the cellular and molecular levels to control basic neuronal processes, as well as for the therapeutic development of drugs targeting different PI3K isoforms for treating brain pathologies.

Author Contributions: C.A.: conceptualization and investigation and manuscript preparation; K.S.-A.: investigation and writing the PI3K and metabolism section; M.F.-L.: investigation and writing the PI3K and genetic control of gene expression section; E.A.-M.: investigation and writing the PI3K and inflammation section; and N.R.-C.: writing the class II and III PI3K and neuronal function sections.

Funding: This research was funded by CONACyT 282470.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Engelman, J.A.; Luo, J.; Cantley, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 606–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hawkins, P.T.; Anderson, K.E.; Davidson, K.; Stephens, L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 647–662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hirsch, E.; Costa, C.; Ciruolo, E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.* **2007**, *194*, 243–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jean, S.; Kiger, A.A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 923–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Falasca, M.; Maffucci, T. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 587–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Devereaux, K.; Dall'Armi, C.; Alcazar-Roman, A.; Ogasawara, Y.; Zhou, X.; Wang, F.; Yamamoto, A.; De Camilli, P.; Di Paolo, G. Regulation of Mammalian Autophagy by Class II and III PI 3-Kinases through PI3P Synthesis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, Q.-W.; Wang, Y.; Wang, T.; Zhang, K.-B.; Jiang, C.-Y.; Hu, F.-F.; Yuan, Y.; Bian, J.C.; Liu, X.Z.; Gu, J.H.; et al. Cadmium-induced autophagy promotes survival of rat cerebral cortical neurons by activating class III phosphoinositide 3-kinase/beclin-1/B-cell lymphoma 2 signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 2912–2918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Van der Heide, L.P.; Ramakers, G.M.J.; Smidt, M.P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Prog. Neurobiol.* **2006**, *79*, 205–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yu, J.; Zhang, Y.; Mellroy, J.; Rordorf-Nikolic, T.; Orr, G.A.; Backer, J.M. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: Stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 1379–1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Trejo, J.L.; Pons, S. Phosphatidylinositol-3-OH kinase regulatory subunits are differentially expressed during development of the rat cerebellum. *J. Neurobiol.* **2001**, *47*, 39–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jaworski, J.; Spangler, S.; Seeburg, D.P.; Hoogenraad, C.C.; Sheng, M. Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11300–11312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chan, C.B.; Ye, K. Multiple Functions of Phosphoinositide-3 Kinase Enhancer (PIKE). *Sci. World J.* **2010**, *10*, 613–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cuesto, G.; Enriquez-Barreto, L.; Carames, C.; Cantarero, M.; Gasull, X.; Sandi, C.; Ferrús, A.; Acebes, Á.; Morales, M. Phosphoinositide-3-Kinase Activation Controls Synaptogenesis and Spinogenesis in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 2721–2733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Akiyama, H.; Kamiguchi, H. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41740–41748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Horwood, J.M.; Dufour, F.; Laroche, S.; Davis, S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *23*, 3375–3384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Sui, L.; Wang, J.; Li, B.-M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* **2008**, *15*, 762–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bruel-Jungerman, E.; Veyrac, A.; Dufour, F.; Horwood, J.; Laroche, S.; Davis, S. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kocsis, K.; Frank, R.; Szabó, J.; Knapp, L.; Kis, Z.; Farkas, T.; Vécsei, L.; Toldi, J. Acetyl-L-carnitine restores synaptic transmission and enhances the inducibility of stable LTP after oxygen-glucose deprivation. *Neuroscience* **2016**, *332*, 203–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Waite, K.; Eickholt, B.J. The neurodevelopmental implications of PI3K signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2010**, *346*, 245–265. [[PubMed](#)]
20. Rivière, J.-B.; Mirzaa, G.M.; O’Roak, B.J.; Beddaoui, M.; Alcantara, D.; Conway, R.L.; St-Onge, J.; Schwartzentruber, J.A.; Gripp, K.W.; Nikkel, S.M.; et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 934–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jansen, L.A.; Mirzaa, G.M.; Ishak, G.E.; O’Roak, B.J.; Hiatt, J.B.; Roden, W.H.; Gunter, S.A.; Christian, S.L.; Collins, S.; Adams, C.; et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain* **2015**, *138*, 1613–1628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Xiao, Z.; Peng, J.; Yang, L.; Kong, H.; Yin, F. Interleukin-1 β plays a role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hippocampal neurons. *J. Neuroimmunol.* **2015**, *282*, 110–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Brandt, C.; Hillmann, P.; Noack, A.; Römermann, K.; Öhler, L.A.; Rageot, D.; Beaufils, F.; Melone, A.; Sele, A.M.; Wymann, M.P.; et al. The novel, catalytic mTORC1/2 inhibitor PQR620 and the PI3K/mTORC1/2 inhibitor PQR530 effectively cross the blood-brain barrier and increase seizure threshold in a mouse model of chronic epilepsy. *Neuropharmacology* **2018**, *140*, 107–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Heras-Sandoval, D.; Pérez-Rojas, J.M.; Hernández-Damián, J.; Pedraza-Chaverri, J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal* **2014**, *26*, 2694–2701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yang, L.; Wang, H.; Liu, L.; Xie, A. The Role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β Signaling in Parkinson’s Disease Dementia. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ali, T.; Kim, T.; Rehman, S.U.; Khan, M.S.; Amin, F.U.; Khan, M.; Ikram, M.; Kim, M.O. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 6076–6093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, S.; Chen, X.; Mao, L.; Zahid, K.R.; Wen, J.; Zhang, L.; Zhang, M.; Duan, J.; Duan, J.; Yin, X.; et al. Histone deacetylase 1 promotes glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Res.* **2018**, *1692*, 154–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Daniel, P.M.; Filiz, G.; Brown, D.V.; Christie, M.; Waring, P.M.; Zhang, Y.; Haynes, J.M.; Pouton, C.; Flanagan, D.; Vincan, E.; et al. PI3K activation in neural stem cells drives tumorigenesis which can be ameliorated by targeting the cAMP response element binding protein. *Neuro Oncol.* **2018**, *20*, 1344–1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Eickholt, B.J.; Ahmed, A.I.; Davies, M.; Papakonstanti, E.A.; Pearce, W.; Starkey, M.L.; Bilancio, A.; Need, A.C.; Smith, A.J.H.; Hall, S.M.; et al. Control of Axonal Growth and Regeneration of Sensory Neurons by the p110 δ PI 3-Kinase. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gaesser, J.M.; Fyffe-Maricich, S.L. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. *Exp. Neurol.* **2016**, *283*, 501–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Gross, C.; Chang, C.-W.; Kelly, S.M.; Bhattacharya, A.; McBride, S.M.J.; Danielson, S.W.; Jiang, M.Q.; Chan, C.B.; Ye, K.; Gibson, J.R.; et al. Increased Expression of the PI3K Enhancer PIKE Mediates Deficits in Synaptic Plasticity and Behavior in Fragile X Syndrome. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 727–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cheng, X.; Li, K.; Liu, M.; Xu, M.; Hu, X.; Yan, R.; Förster, E.; Zhao, S. The effect of P85 on neuronal proliferation and differentiation during development of mouse cerebral cortex. *Dev. Biol.* **2018**, *441*, 95–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Höland, K.; Boller, D.; Hagel, C.; Dolski, S.; Treszl, A.; Pardo, O.E.; Cwiek, P.; Salm, F.; Leni, Z.; Shepherd, P.R.; et al. Targeting Class IA PI3K Isoforms Selectively Impairs Cell Growth, Survival, and Migration in Glioblastoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mirzaa, G.M.; Poduri, A. Megalencephaly and hemimegalencephaly: Breakthroughs in molecular etiology. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **2014**, *166*, 156–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Niswender, K.D.; Morrison, C.D.; Clegg, D.J.; Olson, R.; Baskin, D.G.; Myers, M.G., Jr.; Seeley, R.J.; Schwartz, M.W.; et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: A key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* **2003**, *52*, 227–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Obici, S.; Zhang, B.B.; Karkanas, G.; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1376–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Oh, H.; Boghossian, S.; York, D.A.; Park-York, M. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Res.* **2013**, *1537*, 191–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pardini, A.W.; Nguyen, H.T.; Figlewicz, D.P.; Baskin, D.G.; Williams, D.L.; Kim, F.; Schwartz, M.W. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res.* **2006**, *1112*, 169–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sohn, J.-W.; Oh, Y.; Kim, K.W.; Lee, S.; Williams, K.W.; Elmquist, J.K. Leptin and insulin engage specific PI3K subunits in hypothalamic SFI neurons. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 669–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Agostini, M.; Romeo, F.; Inoue, S.; Niklison-Chirou, M.V.; Elia, A.J.; Dinsdale, D.; Morone, N.; Knight, R.A.; Mak, T.W.; Melino, G. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1502–1514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pearson-Leary, J.; Jahagirdar, V.; Sage, J.; McNay, E.C. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav. Brain Res.* **2018**, *338*, 32–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. McNay, E.C.; Ong, C.T.; McCrimmon, R.J.; Cresswell, J.; Bogan, J.S.; Sherwin, R.S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2010**, *93*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, T.; Shi, Z.; Wang, Y.; Wang, L.; Zhang, B.; Chen, G.; Wan, Q.; Chen, L. Akt3 deletion in mice impairs spatial cognition and hippocampal CA1 long long-term potentiation through downregulation of mTOR. *Acta Physiol.* **2018**, e13167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kim, J.-I.; Lee, H.-R.; Sim, S.; Baek, J.; Yu, N.-K.; Choi, J.-H.; Ko, H.-G.; Lee, Y.S.; Park, S.W.; Kwak, C.; et al. PI3Ky is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1447–1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Choi, J.-H.; Park, P.; Baek, G.-C.; Sim, S.-E.; Kang, S.J.; Lee, Y.; Ahn, S.H.; Lim, C.S.; Lee, Y.S.; Collingridge, G.L.; et al. Effects of PI3K β overexpression in the hippocampus on synaptic plasticity and spatial learning. *Mol. Brain* **2014**, *7*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lin, C.H.; Yeh, S.H.; Lin, C.H.; Lu, K.T.; Leu, T.H.; Chang, W.C.; Gean, P.W. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **2001**, *31*, 841–851. [[CrossRef](#)]
47. Seitz, C.; Hügler, M.; Cristofanon, S.; Tchoghandjian, A.; Fulda, S. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2682–2693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Liu, Q.; Qiu, J.; Liang, M.; Golinski, J.; van Leyen, K.; Jung, J.E.; You, Z.; Lo, E.H.; Degtarev, A.; Whalen, M.J. Akt and mTOR mediate programmed necrosis in neurons. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ribeiro, M.; Rosenstock, T.R.; Oliveira, A.M.; Oliveira, C.R.; Rego, A.C. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *74*, 129–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kim, D.I.; Lee, K.H.; Gabr, A.A.; Choi, G.E.; Kim, J.S.; Ko, S.H.; Han, H.J. A β -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 2820–2834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lim, S.L.; Rodriguez-Ortiz, C.J.; Kitazawa, M. Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Avila-Muñoz, E.; Arias, C. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *18*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Medeiros, R.; LaFerla, F.M. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp. Neurol.* **2013**, *239*, 133–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Heneka, M.T.; O'Banion, M.K.; Terwel, D.; Kummer, M.P. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 919–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Olson, L.; Humpel, C. Growth factors and cytokines/chemokines as surrogate biomarkers in cerebrospinal fluid and blood for diagnosing Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 41–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. McGeer, E.G.; McGeer, P.L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2003**, *27*, 741–749. [[CrossRef](#)]
57. Troutman, T.D.; Bazan, J.F.; Pasare, C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3559–3567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Aksoy, E.; Taboubi, S.; Torres, D.; Delbauve, S.; Hachani, A.; Whitehead, M.A.; Pearce, W.P.; Berenjeno, I.M.; Nock, G.; Filloux, A.; et al. The p110 δ isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1045–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Deng, Q.; Huttenlocher, A. Leukocyte migration from a fish eye's view. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3949–3956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Barberis, L.; Pasquali, C.; Bertschy-Meier, D.; Cuccurullo, A.; Costa, C.; Ambrogio, C.; Vilbois, F.; Chiarle, R.; Wymann, M.; Altruda, F.; et al. Leukocyte transmigration is modulated by chemokine-mediated PI3K γ -dependent phosphorylation of vimentin. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 1136–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Stephens, L.; Milne, L.; Hawkins, P. Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 485–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ferguson, G.J.; Milne, L.; Kulkarni, S.; Sasaki, T.; Walker, S.; Andrews, S.; Crabbe, T.; Finan, P.; Jones, G.; Jackson, S.; et al. PI(3)K γ has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 86–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Smith, D.; Deem, T.; Bruce, A.; Reutershan, J.; Wu, D. Leukocyte phosphoinositide-3 kinase [gamma] is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *80*, 1491–1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Jones, G.E.; Prigmore, E.; Calvez, R.; Hogan, C.; Dunn, G.A.; Hirsch, E.; Wymann, M.P.; Ridley, A.J. Requirement for PI 3-kinase γ in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp. Cell Res.* **2003**, *290*, 120–131. [[CrossRef](#)]
65. Hirsch, E.; Katanaev, V.L.; Garlanda, C.; Azzolino, O.; Pirola, L.; Silengo, L.; Sozzani, S.; Mantovani, A.; Altruda, F.; Wymann, M.P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **2000**, *287*, 1049–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sasaki, T.; Irie-Sasaki, J.; Jones, R.G.; Oliveira-dos-Santos, A.J.; Stanford, W.L.; Bolon, B.; Wakeham, A.; Itie, A.; Bouchard, D.; Kozieradzki, L.; et al. Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **2000**, *287*, 1040–1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Saponaro, C.; Cianciulli, A.; Calvello, R.; Dragone, T.; Iacobazzi, F.; Panaro, M.A. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2012**, *34*, 858–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Chen, G.; Liu, S.; Pan, R.; Li, G.; Tang, H.; Jiang, M.; Xing, Y.; Jin, F.; Lin, L.; Dong, J. Curcumin Attenuates gp120-Induced Microglial Inflammation by Inhibiting Autophagy via the PI3K Pathway. *Cell Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 1465–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Cianciulli, A.; Calvello, R.; Porro, C.; Trotta, T.; Salvatore, R.; Panaro, M.A. PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *36*, 282–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Jung, J.-S.; Choi, M.-J.; Lee, Y.Y.; Moon, B.-I.; Park, J.-S.; Kim, H.-S. Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation by Morin via MAPK, PI3K/Akt, and PKA/HO-1 Signaling Pathway Modulation. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

71. Kim, W.-K.; Hwang, S.-Y.; Oh, E.-S.; Piao, H.Z.; Kim, K.-W.; Han, I.-O. TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7015–7023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhao, M.; Zhou, A.; Xu, L.; Zhang, X. The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons. *Neuroscience* **2014**, *269*, 93–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wang, P.; He, Y.; Li, D.; Han, R.; Liu, G.; Kong, D.; Hao, J. Class I PI3K inhibitor ZSTK474 mediates a shift in microglial/macrophage phenotype and inhibits inflammatory response in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Huang, L.; Sherchan, P.; Wang, Y.; Reis, C.; Applegate, R.L.; Tang, J.; Zhang, J.H. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Contributes to Neuroinflammation in a Rat Model of Surgical Brain Injury. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 10390–10401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mozolewski, P.; Moskot, M.; Jakóbkiewicz-Banecka, J.; Węgrzyn, G.; Bocheńska, K.; Banecki, B.; Gabig-Cimińska, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs modulate cellular glycosaminoglycan synthesis by affecting EGFR and PI3K signaling pathways. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Zhou, H.; Liu, W.; Su, Y.; Wei, Z.; Liu, J.; Kolluri, S.K.; Wu, H.; Cao, Y.; Chen, J.; Wu, Y.; et al. NSAID sulindac and its analog bind RXRalpha and inhibit RXRalpha-dependent AKT signaling. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 560–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Stark, D.T.; Bazan, N.G. Neuroprotectin D1 Induces Neuronal Survival and Downregulation of Amyloidogenic Processing in Alzheimer's Disease Cellular Models. *Mol. Neurobiol.* **2011**, *43*, 131–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Vojtek, A.B.; Taylor, J.; DeRuiter, S.L.; Yu, J.-Y.; Figueroa, C.; Kwok, R.P.; Turner, D.L. Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 4417–4427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Meng, J.; Li, Y.; Camarillo, C.; Yao, Y.; Zhang, Y.; Xu, C.; Jiang, L. The anti-tumor histone deacetylase inhibitor SAHA and the natural flavonoid curcumin exhibit synergistic neuroprotection against amyloid-beta toxicity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Mantamadiotis, T. Towards targeting PI3K-dependent regulation of gene expression in brain cancer. *Cancers* **2017**, *9*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Shi, Z.M.; Han, Y.W.; Han, X.H.; Zhang, K.; Chang, Y.N.; Hu, Z.M.; Qi, H.X.; Ting, C.; Zhen, Z.; Hong, W. Upstream regulators and downstream effectors of NF- κ B in Alzheimer's disease. *J. Neurol Sci.* **2016**, *366*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Chen, Y.L.; Monteith, N.; Law, P.Y.; Loh, H.H. Dynamic association of p300 with the promoter of the G protein-coupled rat delta opioid receptor gene during NGF-induced neuronal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 294–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Chen, Y.L.; Law, P.-Y.; Loh, H.H. NGF/PI3K signaling-mediated epigenetic regulation of delta opioid receptor gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 755–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yamaguchi, A.; Tamatani, M.; Matsuzaki, H.; Namikawa, K.; Kiyama, H.; Vitek, M.P.; Mitsuda, N.; Tohyama, M. Akt Activation Protects Hippocampal Neurons from Apoptosis by Inhibiting Transcriptional Activity of p53. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5256–5264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sanphui, P.; Biswas, S.C. FoxO3a is activated and executes neuron death via Bim in response to β -amyloid. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e625-12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Leng, Y.; Wang, Z.; Tsai, L.K.; Leeds, P.; Fessler, E.B.; Wang, J.; Chuang, D.M. FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is markedly elevated in neurons by mood stabilizers. *Mol. Psychiatry* **2015**, *20*, 215–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Walker, M.P.; LaFerla, F.M.; Oddo, S.S.; Brewer, G.J. Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. *Age (Omaha)* **2013**, *35*, 519–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Narayan, P.J.; Lill, C.; Faull, R.; Curtis, M.A.; Dragunow, M. Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *74*, 281–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Marques, S.C.F.; Lemos, R.; Ferreira, E.; Martins, M.; de Mendonça, A.; Santana, I.; Quteiro, T.F.; Pereira, C.M.F. Epigenetic regulation of BACE1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice. *Neuroscience* **2012**, *220*, 256–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

90. Lu, X.; Deng, Y.; Yu, D.; Cao, H.; Wang, L.; Liu, L.; Yu, C.; Zhang, Y.; Guo, X.; Yu, G. Histone acetyltransferase p300 mediates histone acetylation of PS1 and BACE1 in a cellular model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Spangle, J.M.; Roberts, T.M.; Zhao, J.J. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2017**, *1868*, 123–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jarome, T.J.; Perez, G.A.; Hauser, R.M.; Hatch, K.M.; Lubin, F.D. EZH2 Methyltransferase Activity Controls Pten Expression and mTOR Signaling During Fear Memory Reconsolidation. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 7635–7648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Mastroeni, D.; Delvaux, E.; Nolz, J.; Tan, Y.; Grover, A.; Oddo, S.; Coleman, P.D. Aberrant intracellular localization of H3k4me3 demonstrates an early epigenetic phenomenon in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36*, 3121–3129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Zhang, X.; He, X.; Li, Q.; Kong, X.; Ou, Z.; Zhang, L.; Gong, Z.; Long, D.; Li, J.; Zhang, M.; et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1256–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Griñán-Ferré, C.; Sarroca, S.; Ivanova, A.; Puigoriol-Illamola, D.; Aguado, F.; Camins, A.; Coral, S.; Pallas, M. Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 664–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Chouliaras, L.; Mastroeni, D.; Delvaux, E.; Grover, A.; Kenis, G.; Hof, P.R.; Steinbusch, H.W.M.; Coleman, P.D.; Rutten, B.P.F.; Van den Hove, D.L.A. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 2091–2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Watson, C.T.; Roussos, P.; Garg, P.; Ho, D.J.; Azam, N.; Katsel, P.L.; Haroutunian, V.; Sharp, A.J. Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer's disease. *Genome Med.* **2016**, *8*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Nagata, T.; Kobayashi, N.; Ishii, J.; Shinagawa, S.; Nakayama, R.; Shibata, N.; Kueban, B.; Ohnuma, T.; Kondo, K.; Arai, H.; et al. Association between DNA methylation of the BDNF promoter region and clinical presentation in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra* **2015**, *5*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Posor, Y.; Eichhorn-Gruenig, M.; Puchkov, D.; Schöneberg, J.; Ullrich, A.; Lampe, A.; Muller, R.; Zerbakhsh, S.; Gulluni, F.; Hirsch, E.; et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **2013**, *499*, 233–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Arcaro, A.; Zvelebil, M.J.; Wallasch, C.; Ullrich, A.; Waterfield, M.D.; Domin, J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 3817–3830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Wu, K.; Yang, L.; Chen, J.; Zhao, H.; Wang, J.; Xu, S.; Huang, Z. miR-362-5p inhibits proliferation and migration of neuroblastoma cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase-C2β. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1911–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Garcia, M.D.; Formoso, K.; Aparicio, G.I.; Frasca, A.C.C.; Scorticati, C. The Membrane Glycoprotein M6a Endocytic/Recycling Pathway Involves Clathrin-Mediated Endocytosis and Affects Neuronal Synapses. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Vagnozzi, A.N.; Praticò, D. Endosomal sorting and trafficking, the retromer complex and neurodegeneration. *Mol. Psychiatry* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wu, J.; Petralia, R.S.; Kurushima, H.; Patel, H.; Jung, M.; Volk, L.; Chowdhury, S.; Shepherd, J.D.; Dehoff, M.; Li, Y.; et al. Arc/Arg3.1 Regulates an Endosomal Pathway Essential for Activity-Dependent β-Amyloid Generation. *Cell* **2011**, *147*, 615–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Domin, J.; Gaidarov, I.; Smith, M.E.; Keen, J.H.; Waterfield, M.D. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11943–11950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Gaidarov, I.; Smith, M.E.; Domin, J.; Keen, J.H. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 443–449. [[CrossRef](#)]
107. Meunier, F.A.; Osborne, S.L.; Hammond, G.R.V.; Cooke, F.T.; Parker, P.J.; Domin, J.; Schiavo, G. Phosphatidylinositol 3-Kinase C2α Is Essential for ATP-dependent Priming of Neurosecretory Granule Exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 4841–4851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

108. Shiwarski, D.J.; Darr, M.; Telmer, C.A.; Bruchez, M.P.; Puthenveedu, M.A. PI3K class II α regulates δ -opioid receptor export from the *trans*-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 2202–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Hauswirth, A.G.; Ford, K.J.; Wang, T.; Fetter, R.D.; Tong, A.; Davis, G.W. A postsynaptic PI3K-cII dependent signaling controller for presynaptic homeostatic plasticity. *Elife* **2018**, *7*, e31535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Byfield, M.P.; Murray, J.T.; Backer, J.M. hVps34 Is a Nutrient-regulated Lipid Kinase Required for Activation of p70 S6 Kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33076–33082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Zhou, F.; Yang, Y.; Xing, D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J.* **2011**, *278*, 403–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Komatsu, M.; Ichimura, Y. MBSJ MCC Young Scientist Award 2009 REVIEW: Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells* **2010**, *15*, 923–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Gerónimo-Olvera, C.; Montiel, T.; Rincon-Heredia, R.; Castro-Obregón, S.; Massieu, L. Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Issman-Zecharya, N.; Schuldiner, O. The PI3K Class III Complex Promotes Axon Pruning by Downregulating a Ptc-Derived Signal via Endosome-Lysosomal Degradation. *Dev. Cell* **2014**, *31*, 461–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal

Received: 8 February 2021 | Revised: 27 April 2021 | Accepted: 17 May 2021

DOI: 10.1096/fj.202100243R

RESEARCH ARTICLE

THE FASEB JOURNAL

Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal cells

Karina Sánchez-Alegría¹ | Carlos Ernesto Bastián-Eugenio² | Luis Vaca² | Clorinda Arias¹

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510, Ciudad de México, Mexico.
Email: carias@unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Grant/Award Number: A1-S9559; UNAM Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA, UNAM), Grant/Award Number: IN202318

Abstract

Palmitic acid (PA) is a saturated fatty acid whose high consumption has been largely associated with the development of different metabolic alterations, such as insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. Particularly in the brain, insulin signaling disruption has been linked to cognitive decline and is considered a risk factor for Alzheimer's disease. Cumulative evidence has demonstrated the participation of PA in the molecular cascade underlying cellular insulin resistance in peripheral tissues, but its role in the development of neuronal insulin resistance and the mechanisms involved are not fully understood. It has generally been accepted that the brain does not utilize fatty acids as a primary energy source, but recent evidence shows that neurons possess the machinery for fatty acid β -oxidation. However, it is still unclear under what conditions neurons use fatty acids as energy substrates and the implications of their oxidative metabolism in modifying insulin-stimulated effects. In the present work, we have found that neurons differentiated from human neuroblastoma MSN exposed to high but nontoxic concentrations of PA generate ATP through mitochondrial metabolism, which is associated with an increase in the cytosolic Ca^{2+} and diminished insulin signaling in neurons. These findings reveal a novel mechanism by which saturated fatty acids produce Ca^{2+} entry and insulin resistance that may play a causal role in increasing neuronal vulnerability associated with metabolic diseases.

KEYWORDS

intraneuronal Ca^{2+} , neuronal insulin resistance, neuronal β -oxidation, palmitic acid, PKC activation

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BIM, bisindolylmaleimide 1; BSA, bovine serum albumin; CPT1, carnitine palmitoyltransferase I; DHA, docosahexaenoic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; ECL, enhanced chemiluminescence; FBS, fetal bovine serum; GPR40, G-protein-coupled receptor 40; HFD, high-fat diet; InRs, insulin receptors; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NGF, nerve growth factor; PA, palmitic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PKC, protein kinase C; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; RNA, ribonucleic acid; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SEM, standard error of the mean; VGCCs, voltage-gated calcium channels.

© 2021 Federation of American Societies for Experimental Biology

The FASEB Journal. 2021;35:e21712.
<https://doi.org/10.1096/fj.202100243R>

wileyonlinelibrary.com/journal/fsb2 | 1 of 13

1 | INTRODUCTION

A variety of metabolic disorders frequently due to the consumption of hypercaloric high-fat and high-sugar diets are increasing worldwide and have reached epidemic proportions. Epidemiological studies have shown an important correlation between the presence of metabolic alterations and the increased risk of developing cognitive impairments.¹⁻⁶ The consumption of a high-fat diet (HFD) produces neuronal insulin resistance associated with reduced long-term potentiation and synaptic plasticity.^{2,7-10} The saturated fatty acid palmitic acid (PA) is the most abundant component of the HFD, whose role in the molecular cascade underlying cellular insulin resistance in peripheral tissues,¹¹⁻¹⁶ as well as in neurons,^{10,17-21} has been documented, although the precise molecular mechanisms are not fully understood. In the brain, insulin is involved in a broad spectrum of actions, including energy homeostasis^{22,23} and activation of signaling pathways linked to neuronal growth, plasticity and survival.²⁴⁻²⁶ Insulin receptors (InRs) are widely distributed in the brain, and their functionality has been established as an important regulator of synapse formation and remodeling,²⁴ neuronal plasticity,²⁷ and neuronal survival.^{23,28-30} Thus, a reduction in insulin-mediated processes has important implications in brain function, but the mechanism by which fatty acids reduce insulin sensitivity in neurons remains unclear. We have previously reported that PA blocks insulin-induced metabolic activation and that the inhibition of the insulin/PI3K/Akt pathway is associated with a reduction in the NAD⁺/NADH ratio and ROS production in both differentiated human neuroblastoma cells and cultured hippocampal neurons,^{20,31} suggesting that PA exerts effects on insulin signaling through a pathway involving its intracellular metabolism. Although neurons possess the machinery for fatty acid β -oxidation, it is still unknown under what conditions or to what extent neurons can use fatty acids as energy substrates^{32,33} and whether metabolic oxidation is involved in the mechanism that produces insulin resistance, as occurred in peripheral organs such as in the liver. In addition to the intraneuronal metabolism of PA, some actions of this fatty acid can be mediated through the activation of G-protein-coupled receptor 40 (GPR40), which is highly concentrated in the brain.³⁴ In peripheral tissues, PA-mediated GPR40 signaling modulates the insulin pathway due to activation of PKCs by calcium released from the endoplasmic reticulum.³⁵⁻³⁸ GPR40 is activated by long-chain fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA),³⁹ but few studies have shown that PA activates these receptors in neurons.^{21,40} In the present work, we aimed to investigate whether the intraneuronal oxidative metabolism of PA and/or the activation of GPR40 by PA participates in the molecular mechanism that leads to insulin resistance in neurons.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Human neuroblastoma cells (MSNs) (SMS-MSN, RRID:CVCL_7135)⁴¹ were maintained in RPMI 1640 medium containing nonessential amino acids plus 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, CA). The maximum number of passages for cell line was 20. The cells were grown in an atmosphere of 5% CO₂/95% O₂ at 37°C. Twenty-four hours after plating, neuroblastoma cells were differentiated into mature neurons by adding retinoic acid (10 μ M) plus nerve growth factor (NGF; 50 ng/mL) for 5 days (see Figure 1). This protocol for the differentiation of human neuroblastoma cells is similar to that reported by Encinas⁴² and yields homogeneous populations of neuronal cultures that exhibit many characteristics of mature neurons,⁴³ such as long and extensively branched neurites and the expression of mature neurons such as the microtubule-associated protein 2.⁴²

At the end of the differentiation period, the incubation medium was replaced by fresh medium free of FBS. Insulin (10 μ M) was added for 15 minutes to stimulate Akt phosphorylation in the absence or presence of PA. In this last condition cells were preincubated with PA (200 μ M) for 1 hour at 37°C. The dose of PA is non-toxic for differentiated MSN cells²⁰ and is close to the PA concentration found in plasma from obese and diabetic patients.⁴⁴

2.2 | Microtubule-associated protein 2 staining

After the differentiation period MSN cells were washed three times with ice-cold PBS. Then, the cells were fixed with ice-cold paraformaldehyde 1%/PBS for 5 minutes and washed three times with PBS and permeabilized in 0.3% Triton X-100/PBS for 30 minutes at room temperature (RT). After incubation with blocking solution (BSA 4%/PBS) for 1 hour the cells were incubated with anti-MAP2 antibody (1:1000, Millipore Cat# MAB378, RRID:AB_94967) for 24 hours, at 4°C. After washing three times in 0.3% Triton X-100/PBS, cells were incubated with secondary antibody Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:1000, Thermo Fisher Scientific Cat# A-21202, RRID:AB_141607) for 2 hours, at RT. Immediately after incubation with the secondary antibody, nuclei were stained with Hoechst (1:1000, Thermo Fisher Scientific Cat# H3570) in PBS for 10 minutes at RT. Cells were washed three times with PBS and covered with fluorescent mounting medium (DAKO Cat# S3024). Cells were visualized in a confocal microscopy (Nikon A1R, Nikon Instruments Inc) and digital images were obtained with NIS-Elements C imaging software (Nikon).

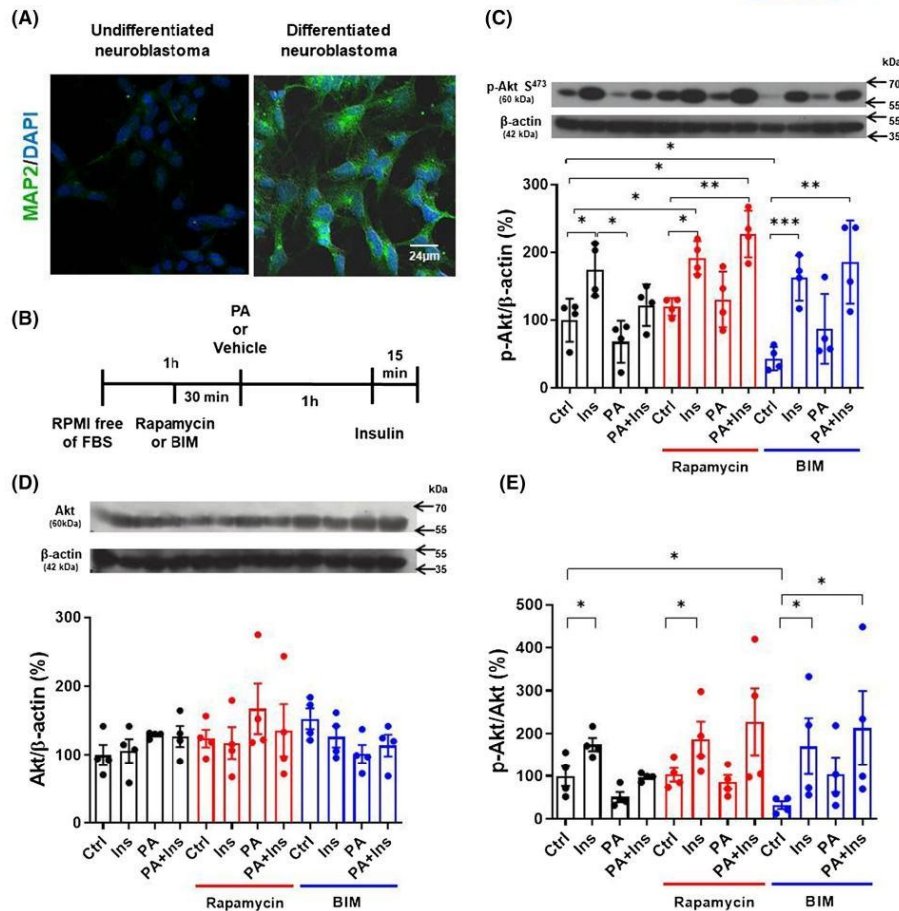


FIGURE 1 PA-induced insulin resistance in neurons can be blocked by mTOR and PKC inhibition. Differentiated MSN cells were treated with PA, rapamycin (100 nM) or BIM (1 μM). A, Human MSN cells stained with MAP2 after differentiation. B, Experimental protocol and timeline. C, Cells were stimulated with insulin (15 minutes) in the absence or presence of 200 μM PA that was incubated 1 hour prior to the insulin stimuli. Phosphorylated Akt (S473) was detected by western blot. Densitometric analysis of phospho-AktS473 bands is depicted and normalized to actin (D) and total Akt (E). Mean percentages ± SEM are shown from 4 independent cultures. In order to compare all groups, two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons was used. The results are expressed as the mean ± SEM (n = 4). *P < .05, **P < .01, ***P < .001

2.3 | Palmitic acid preparation

We prepared an initial stock solution of 200 mM sodium palmitate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO Cat# P9767) in molecular grade absolute ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). This stock solution was stored at -20°C and used within 2 months. On the day of the experiment, a fresh working solution of 5 mM was made using sterile 10% bovine serum albumin (BSA)/phosphate buffered saline (PBS) and

incubated at 37°C until complete dissolution was obtained. We used BSA as a carrier protein to allow the fatty acid to remain in solution.

2.4 | Western blotting

Human neuroblastoma cells were plated at a density of 3×10^5 in 35-mm plates. After the differentiation period,

neuronal cells were exposed to different conditions: PBS-BSA 10% plus ethanol (vehicle), insulin (10 μ M, Sigma-Aldrich) for 15 minutes, PA (200 μ M) for 1 hour, and PA for 1 hour followed by a 15-minutes insulin stimulus. To analyze the effect of mTORC1 inhibition, neuronal cells were incubated with rapamycin (100 nM, Sigma-Aldrich Cat# 8781), and for the involvement of PKC activation, other cells were exposed to the PKC antagonist bisindolylmaleimide 1 (BIM) (1 μ M, Calbiochem Cat# 203 290) for 30 minutes prior to PA. The doses were selected from previous studies that demonstrated the ability to inhibit these kinases.^{20,45,46} The cells were lysed with 200 μ L/plate RIPA lysis buffer (50 mM TRIS, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40; complete protease inhibitor cocktail from Roche Diagnostics) at 4°C. Protein concentration was determined using the Bio-Rad DC protein assay kit. Protein samples were boiled in Laemmli buffer for 10 minutes, and 20 μ g of protein was loaded in a 10% acrylamide-SDS gel. Then, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, England) and blocked with 5% nonfat milk-TBS-T for 2 hours at room temperature (RT). Membranes were then incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: p-Akt S473 (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9271, RRID:AB_329825), Akt (1:1000, Cell Signaling Technology Cat# 9272, RRID:AB_329827), p-PKC α S657 (1:500, Millipore Cat# 06-822, RRID:AB_310258), and β -actin (1:1000, Sigma-Aldrich Cat# A5316, RRID:AB_476743). Next, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1:12 000, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2005, RRID:AB_631736) or goat anti-rabbit antibody (1:12 000, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2004, RRID:AB_631746) for 2 hours, at RT. Membrane signals were revealed using a chemiluminescence substrate (Millipore Cat# WBKLS0500) on Kodak X-Omat film. Bands were densitometrically analyzed using ImageJ software. We normalized the data by dividing the obtained values for each band into the respective actin loading control value and obtained a ratio. This value was then expressed as a percent of the control for each experiment.

2.5 | RT-PCR

Total RNA was isolated from differentiated MSN cells using TRIzol Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and cDNA was synthesized from 1000 ng of RNA by the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, WI Cat# A3800) with oligo(dT) primers. Both synthesized RNA and cDNA were quantified using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Gpr40 gene expression was determined using the Power SYBR Green PCR Master Mix PCR kit (Thermo Fisher

Scientific Cat# 4 368 577). The sequences of the primers were as follows: F. 5'-CCA GCT TCC TGT ACC CCA AT -3' and R. 5'-GTC ACC AGC GGA TTA AGC AC -3' (Integrated DNA Technologies). The amplified products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and detected under UV light. For each experimental sample, triplicate determinations were performed, and negative (distilled water) and positive controls (mRNA from leukocytes) were included.

2.6 | Ca²⁺ measurements

Ca²⁺ levels were measured using Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific Cat# F14201) and fluorescence microscopy. MSN cells were grown on 25-mm coverslips at a density of 1×10^5 per 35-mm plate. After the differentiation period, cells were incubated with RPMI without serum containing 5 μ M Fluo-4 AM plus 1% pluronic acid for 45 minutes at 37°C. The cells were rinsed with RPMI without serum and incubated 15 minutes at 37°C. For image acquisition, cells were maintained in Krebs-Ringer solution (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, 1.8 mM CaCl₂, 500 μ M EGTA, pH 7.4) with or without Ca²⁺ and exposed to the following treatments: 200, 250 and 300 μ M PA; 100 μ M DHA (Sigma-Aldrich Cat# D2534), 100 μ M etomoxir for 45 minutes (Cayman Chemical Cat# 11 969) plus PA, 10 U/mL apyrase for 10 minutes (Sigma-Aldrich Cat# A6410) plus PA; 100 μ M diazoxide for 10 minutes (Sigma-Aldrich Cat# D9035) plus PA; and 10 μ M GW1100 for 10 minutes (Cayman Chemical Cat# 10 008 908) plus DHA. Ca²⁺ dynamics were measured in individual cells (20 cells/coverslip/condition) using a wide-field inverted IX81 Olympus® microscope with a $\times 60$ 1.42 NA oil immersion objective, MT-20 illumination system, 484/25 nm excitation filter and 520/40 nm emission filter with an EMCCD camera iXon-897 (Andor Technology, South Windsor, CT, USA). Images were acquired every two seconds for 20 minutes and were analyzed using Olympus Cell-R software. Image analysis was realized in Fiji,⁴⁷ the Fluo-4 fluorescence signal was normalized using the resting level (F/F₀) calculated during the initial 3-minutes recording period. To compare the Ca²⁺ increase after each experimental condition, the maximum signal values were obtained (F_{max}-F_{resting} level, ΔF) and statistical analysis was performed. Each experiment was performed in triplicate by analyzing 3 fields (20 cells per field) of each coverslip.

2.7 | ATP quantification

ATP levels were measured using a Luminescent ATP Detection Assay Kit (Abcam Cat# ab113849). Cells were

grown in 96-well plates at a density of 83×10^3 cells/well. After differentiation, neuronal cells were incubated with the following conditions: insulin 15 minutes; PA 6 minutes; etomoxir plus PA 6 minutes, PA 1 hour; etomoxir plus PA 1 hour; and PA 1 hour plus insulin 15 minutes. After incubation, the detergent solution was added, and plates were shaken for 5 minutes. Then, the substrate solution containing luciferase enzyme and luciferin was added with shaking for an additional 5 minutes. Plates were covered and kept in the dark for 10 minutes, and the luminescence was then measured using the SynergyTM H4 hybrid multi-mode microplate reader.

2.8 | Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons among groups were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post hoc test, two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons or, Student's t-test as indicated in each figure legend. $P < .05$ was considered significant. GraphPad Prism 8.0 was used for graphs and statistical analysis is presented as dot plot graphs. Results are expressed as the percent relative to the control groups which in all cases contained the vehicle solution where PA was prepared.

3 | RESULTS

3.1 | PA reduces insulin signaling through activation of mTOR and PKCs

Differentiated human neuroblastoma cells were used throughout the study as a model of mature neurons, and the differentiation state of cells was determined by labeling with microtubule-associated protein 2 (Figure 1A). Because mTOR complex 1 (mTORC1) can act as a nutrient sensing kinase that is activated by cellular energy levels,⁴⁸ we first analyzed its participation in the PA-dependent reduction in insulin signaling. Therefore, we examined the effects of insulin stimuli on p-AktS473 in the presence of PA and when mTORC1 was inactivated. As shown in Figure 1, the PA inhibitory effect on insulin-mediated Akt activation was completely prevented by rapamycin, indicating that mTORC1 activity is involved in PA-mediated inhibition (Figure 1C-E). Given that considerable evidence has implicated the mTOR pathway as a downstream effector of PKC,^{49,50} we examined the effect of bisindolylmaleimide 1 (BIM), a broad inhibitor of conventional and novel PKC isoforms, on the inhibitory effect of PA on insulin signaling. In the presence of BIM, cells did not exhibit the inhibitory effect of PA, and in addition, we observed that

BIM significantly decreased the levels of p-AktS473 in the absence of insulin (Figure 1C-E), suggesting that PKC activity participates in the basal Akt activation.

3.2 | PA induces Ca^{2+} mobilization in neuronal cells

Since classical PKCs are activated by Ca^{2+} and there are several studies in peripheral cells showing that PA can mobilize Ca^{2+} through GPR40 activation,³⁷ we wanted to assess whether the inhibitory effects of PA on neuronal insulin signaling were mediated by this mechanism. Using end-point RT-PCR, we first determined the presence of GPR40 mRNA in differentiated MSN neurons compared with the receptor contents in white blood cells (Figure 2A). As we confirmed the presence of significant GPR40 mRNA expression, we next examined whether PA increased Ca^{2+} levels through the activation of this receptor at three different concentrations. In Figure 2B the experimental design and treatment timeline are shown. The acute administration of PA increased Ca^{2+} at the three doses tested, reaching a maximum value after 10 minutes of exposure and showing a sustained increase and an oscillatory pattern (Figure 2C,D). To compare this PA-elicited intracellular Ca^{2+} elevation with other agonists of GPR40, we analyzed the effect of docosahexaenoic acid (DHA), which has been recognized as an endogenous ligand of this receptor. As expected, DHA at 100 μM was able to increase Ca^{2+} levels in neurons, although in a lower proportion than PA (Figure 2E,F).

3.3 | PA promotes Ca^{2+} entry by a mechanism independent of GPR40 signaling

Given that the PA-increased cytosolic Ca^{2+} showed a sustained and long-lasting pattern, suggesting the activation of a mechanism that does not desensitize, we wanted to assess the source of Ca^{2+} and the contribution of the ER- Ca^{2+} pool. Interestingly, when the external Ca^{2+} was removed from the medium, PA failed to increase the cytosolic Ca^{2+} concentration, and the effect of PA returned when this cation was added to the medium (Figure 3A,B), indicating that external Ca^{2+} is the main source that responds to PA exposure and not ER- Ca^{2+} , as expected when GPR40 is activated. To further analyze this conclusion, we studied the effect of DHA in calcium-free medium and in the presence of the GPR40 antagonist GW1100. In the absence of external Ca^{2+} , DHA still increased intraneuronal Ca^{2+} , and this increase was totally prevented when the cells were preincubated with the antagonist GW1100 (Figure 3C,D). These results confirm that DHA increases

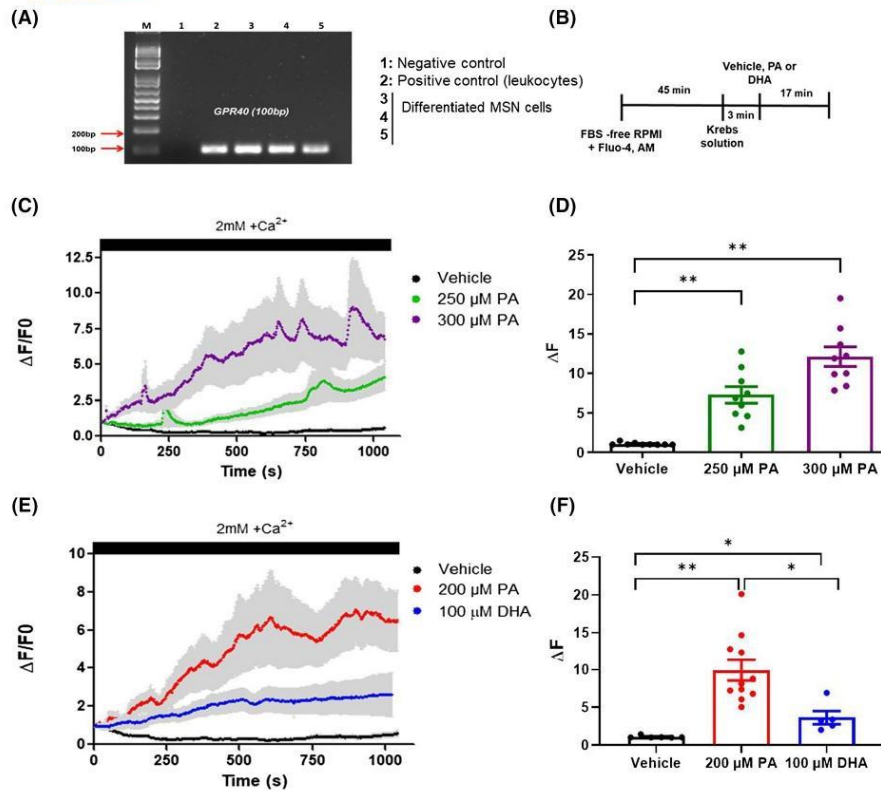


FIGURE 2 PA increased intracellular Ca²⁺ concentrations in neuronal cells. Intracellular Ca²⁺ concentration of differentiated MSN cells was evaluated by the Fluo-4 AM fluorescence ratio in response to PA and DHA. A, Expression levels of GPR40 in neuronal cells, with the negative control (distilled water) and positive control (mRNA from leukocytes). B, Experimental protocol and timeline. C, Changes in internal Ca²⁺ induced by PA at 300 and 250 μ M expressed as the mean \pm SEM of fluorescence normalized vs. the resting levels ($\Delta F/F0$). D, Quantification of the increment of Fluo-4 AM calculated by the difference in fluorescence levels between $F_{max} - F_{basal}$ (ΔF). E, Comparison between Ca²⁺ kinetics in the presence of PA 200 μ M and DHA 100 μ M and (F) increment of the Fluo-4 AM ratio (ΔF). The results are expressed as the mean \pm SEM (from 9 independent cultures and 20 cells per condition in triplicate). Statistical analysis was one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post hoc test * $P < .05$, ** $P < .01$, $n = 9$

cytosolic Ca²⁺ levels by GPR40 signaling, but PA promotes Ca²⁺ entry by a mechanism independent of the GPR40 receptor.

3.4 | ATP generated from mitochondrial PA metabolism regulates Ca²⁺ entry

In hypothalamic neurons, saturated free fatty acids are able to depolarize them by increasing ATP via β -oxidation.⁵¹ Thus, we first wanted to analyze ATP production by PA metabolism in human neurons. ATP can regulate Ca²⁺ entry by two mechanisms: by closing the ATP-sensitive

potassium channels (K_{ATP}) and promoting the opening of voltage-gated calcium channels (VGCCs) after cell depolarization and/or by activating purinergic channels by released ATP. To assess whether PA induces Ca²⁺ entry by any of these mechanisms, we first tested whether PA is metabolized by the mitochondria and thereby increases intraneuronal ATP levels. We have previously reported that both insulin and PA treatment increased the metabolic activity of differentiated MSN cells, as observed by the increase in MTT reduction by mitochondrial dehydrogenases.²⁰ Here, we found that both insulin and PA increased ATP levels 6 minutes and 1 hour after exposure. As shown in Figure 4, PA induced a three-fold increase in ATP after 6 minutes

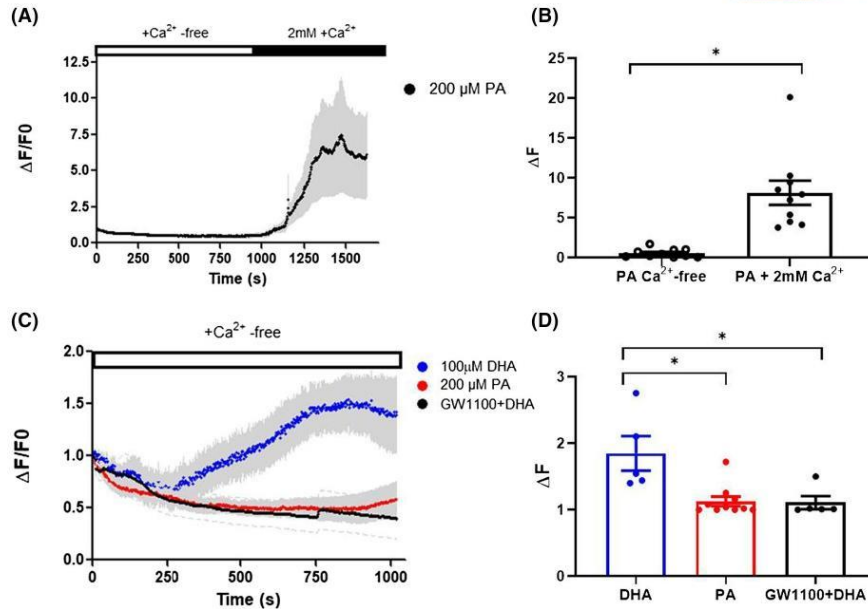


FIGURE 3 PA increased the intracellular Ca^{2+} concentration independent of GPR40 activation. The Fluo-4 AM fluorescence ratio in response to PA and DHA in the absence or presence of extracellular Ca^{2+} . PA exposure increases the internal Ca^{2+} concentration only in the presence of external Ca^{2+} (A), average trace and (B), quantification of changes). The DHA-dependent increase in Ca^{2+} was completely blocked in the presence of the GPR40 antagonist GW1100 (C), average trace and (D), quantification of changes). Data show the mean \pm SEM from 10 ((A, B) and 5-10 (C, D)) independent cultures containing 20 cells per condition in triplicate). Statistical analysis was Student's t-test for paired samples (B) and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post hoc test (D) * $P < .05$, $n = 10$ (A,B), $n = 5$ (DHA), $n = 10$ (PA), $n = 5$ (GW1100 + DHA)

(the time at which we found significant calcium mobilization) and remained elevated after 1 hour. Interestingly, PA-induced ATP production was prevented when cells were preincubated with etomoxir, an inhibitor of the carnitine palmitoyltransferase that blocks β -oxidation (Figure 4A), indicating that the rise in ATP is due to the mitochondrial metabolism of PA. Then, we evaluated whether the increase in Ca^{2+} by PA was dependent on ATP production. In Figure 4B the experimental design and treatment timeline are shown. We exposed cells to etomoxir before PA, and we did not find a previously observed increase in intraneuronal Ca^{2+} (Figure 4C,D), demonstrating that ATP produced by PA metabolism is associated with Ca^{2+} entry. To evaluate by which mechanism ATP regulates the entry of Ca^{2+} by PA, cells were treated with the enzyme apyrase to hydrolyze extracellular ATP, which might prevent the activation of the purinergic P2X receptors associated with Ca^{2+} entry.⁵² Although a reduction in PA-dependent Ca^{2+} entry was observed in the presence of apyrase, it was not totally impaired (Figure 4E,F). However, when neuronal cells were exposed to diazoxide, which opens the K_{ATP} , leading

to hyperpolarization of the cell and preventing the opening of the VGCCs, complete inhibition of PA-induced Ca^{2+} mobilization was observed (Figure 4E,F).

3.5 | PA-dependent intraneuronal Ca^{2+} increase is associated with insulin resistance

Since we observed the involvement of ATP in the PA-dependent Ca^{2+} mobilization, we wanted to assess whether the Ca^{2+} that enters neuronal cells participates in the mechanism associated with insulin resistance. To examine the insulin-mediated activation of Akt, differentiated human MSN cells were incubated in the presence and absence of Ca^{2+} and with and without PA. As observed in Figure 5A, the absence of extracellular Ca^{2+} prevented the inhibitory effect of PA on insulin-mediated activation of Akt, indicating that the mechanism by which PA induces insulin resistance is associated with Ca^{2+} dysregulation that may activate PKC, as suggested by the experiments with BIM. In addition, PA promoted phosphorylation of PKC- α at S657 (Figure 5B) in

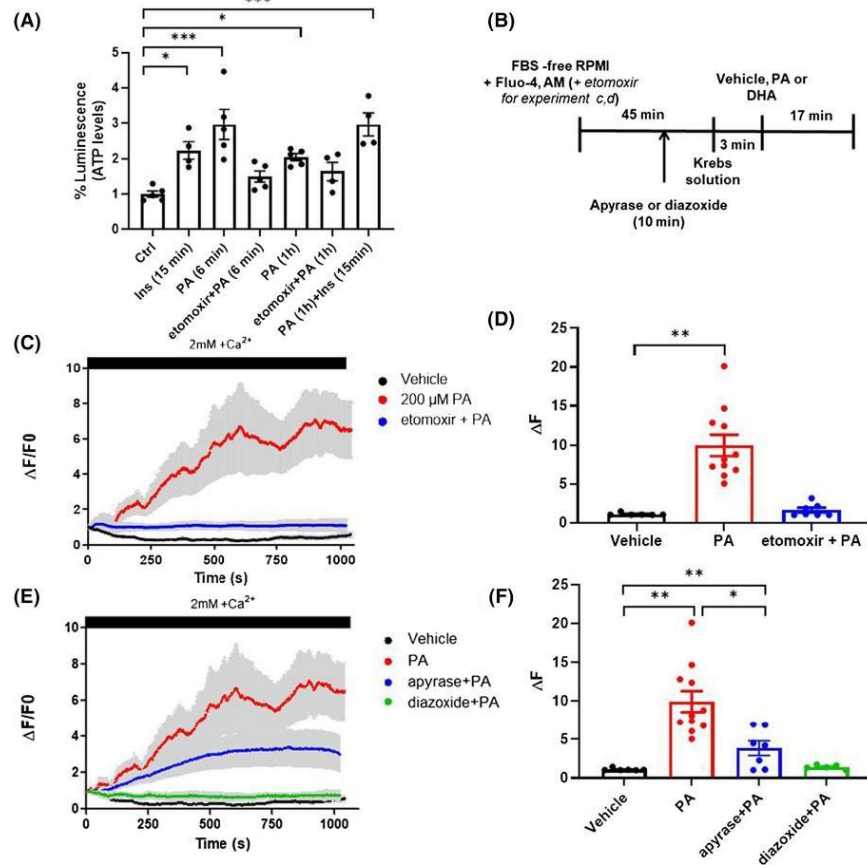


FIGURE 4 Role of β -oxidation on PA-dependent ATP production and Ca^{2+} mobilization. A, ATP levels were increased after cell exposure to insulin, 15 minutes or PA, 6 minutes (100% and 150%, respectively). The PA-induced increase in ATP remained after 1 hour and was blocked by the carnitine palmitoyl transferase inhibitor, etomoxir. Data represents the mean \pm SEM from 4-5 independent cultures in quadruplicate. B, Experimental protocol and timeline. PA-induced changes in Ca^{2+} dynamics were also inhibited by etomoxir ((C) and quantification in (D)). Ca^{2+} responses to PA in MSNs in the presence of the K^+_{ATP} channel activator diazoxide and with the enzyme apyrase to hydrolyze external ATP ((E) and quantification in (F)). The results are expressed as the mean \pm SEM (from 6-11 independent cultures, each with 20 cells per condition in triplicate). Statistical analysis was one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post hoc test * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$; n = 4-5 (a); c: n = 5 (veh), n = 10 (PA), n = 6 (etomoxir + PA); d: n = 6 (veh), n = 11 (PA), n = 7 (apyrase + PA), n = 5 (diazoxide + PA)

the presence of external Ca^{2+} , thereby supporting the notion that PA-dependent Ca^{2+} influx precedes the activation of this kinase.

4 | DISCUSSION

The modulating effects of PA on intracellular signaling pathways and transcription factors, along with its use as energy supply or precursor for the synthesis of ceramides, and the

production of inflammatory mediators have been implicated in the development of insulin resistance.^{20,31,53-56}

In this report, we characterized the nature of PA-induced Ca^{2+} signals that contribute to impaired insulin signaling in human neuronal cells. We have provided evidence that the ATP generated by the PA metabolism is associated with elevated levels of cytosolic free Ca^{2+} concentrations that diminish the insulin-dependent Akt phosphorylation in a similar manner to that produced by PKC activation. Although saturated fatty acids induce insulin resistance through different

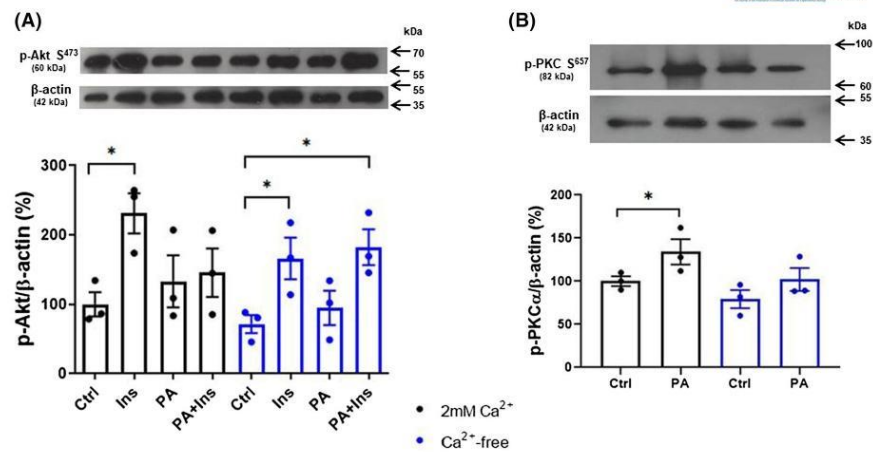


FIGURE 5 Effect of external Ca^{2+} on PA-dependent insulin-signaling reduction and PKC- α activation. A, Representative western blot and densitometric analysis of p-Akt S473 from differentiated human neuroblastoma cells exposed for 1 hour to 200 μM PA and after 15 minutes of insulin stimulation in the presence and absence of external Ca^{2+} . B, Representative western blot and densitometric analysis of p-PKC S657. Mean percentages \pm SEM are shown from 3 independent cultures. Statistical analysis was one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett post hoc test * $P < .05$; $n = 3$

metabolic pathways in different peripheral cells, we have added new evidence that strongly suggests that PA can be metabolized by the β -oxidative pathway generating a marked elevation of ATP which was associated with a diminished responsiveness to insulin in neuronal cells.

We have analyzed the short-term effects of PA in neurons at a high dose that does not produce acute neurotoxicity^{20,31} and is similar to the concentration found in the plasma of subjects with obesity and diabetes.^{44,57} Free fatty acids can cross the blood-brain barrier,⁵⁸ and recent studies have reported increased PA concentration in CSF from obese subjects compared with healthy humans,^{56,59} suggesting that neurons can be exposed to high concentration of PA under obesity.

To our knowledge, this is the first evidence that PA can be metabolized by neuronal cells, producing a significant increase in ATP levels that was associated with Ca^{2+} mobilization. With the exception of astrocytes⁶⁰ and hypothalamic neurons,^{61,62} it has been largely accepted that free fatty acids are not significantly oxidized by neurons because they do not possess an active machinery for mitochondrial β -oxidation.⁶³ However, we found that the ATP produced by differentiated human neuroblastoma cells after PA exposure was totally blocked by the CPT1-specific inhibitor etomoxir, which prevents the transport of activated fatty acids into the mitochondrial matrix for further metabolization. In previous works, we have also demonstrated that in both, cultured hippocampal neurons and differentiated human MSN cells, PA exposure reduces the NAD/NADH ratio and increases MTT reduction, which also indicates that PA is able to stimulate oxidative

metabolism in neurons.^{20,31} Although the role of fatty acid β -oxidation as a sensor mechanism of nutrient availability in hypothalamic neurons is well known,⁶¹ the present results suggest that neurons exposed to high concentrations of free fatty acids, as can occur in diabetic and obese subjects,⁴⁴ may undergone detrimental effects with respect the lack of insulin sensitivity and Ca^{2+} dyshomeostasis.

Because GPR40, also known as free fatty acid receptor 1 (FFAR1), is highly concentrated in the brain, we first determined its possible role in the PA-dependent effects on insulin signaling through Ca^{2+} mobilization. GPR40 is known to signal predominantly via the heterotrimeric G proteins Gq/11, releasing Ca^{2+} from internal stores and producing diacylglycerol that activates PKCs. It was surprising that the Ca^{2+} mobilized by PA was totally dependent on external Ca^{2+} , so we can exclude the role of GPR40 activation after PA exposure in these experiments. As expected, the other well-known GPR40 ligand DHA increased the internal Ca^{2+} concentration in a manner that was independent of external Ca^{2+} and totally prevented by the GPR40 antagonist GW1100. Although it has been demonstrated the participation of GPR40 on PA-dependent Ca^{2+} mobilization in hypothalamic neurons,²¹ in a pancreatic β -cell line, the PA-induced intracellular Ca^{2+} increase after GPR40 activation was dependent on extracellular Ca^{2+} and was blocked by inhibiting the voltage-dependent Ca^{2+} channels or by opening the K_{ATP} channel.³⁷ In same β -cells, the apoptosis induced by PA was prevented by the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA and by L-type Ca^{2+} channel blockers.⁶⁴ Furthermore, in neuroblastoma cells GPR40 was

activated by DHA and selective agonists, but not by PA similar to what we have found in the present work.³⁹

Although the precise mechanism by which PA induces a high internal Ca^{2+} concentration remains unclear, two possibilities have been proposed and analyzed in the present study, both implicating PA-dependent ATP production in neurons. One mechanism seems to be associated with the closing of K_{ATP} channels, which leads to neuronal depolarization and the consequent opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels, as has been observed in hypothalamic neurons as a mechanism involved in the regulation of systemic glucose levels⁶⁵ and in pancreatic β -cells for glucose-dependent insulin secretion.⁶⁶ The participation of this mechanism in our results was demonstrated by the fact that in the presence of etomoxir, which prevents ATP production by inhibiting PA β -oxidation, Ca^{2+} influx was abolished. In addition, when cells were coincubated with PA and with the K_{ATP} activator diazoxide, Ca^{2+} influx was also prevented. Another mechanism for ATP-dependent Ca^{2+} mobilization could be associated with the release of ATP, which activates the ionotropic purinergic receptor P2X, leading to a transient increase in Ca^{2+} concentration through voltage-gated Ca^{2+} channels.⁶⁷ To test this hypothesis, we used the enzyme apyrase to hydrolyze external ATP to prevent the activation of P2X receptors. Although a small reduction in PA-dependent Ca^{2+} influx was achieved in the presence of apyrase, the inhibitory effect on

Ca^{2+} elevation was more robust when K_{ATP} channels were activated by diazoxide, suggesting that during neuronal depolarization, this mechanism is the more prominent, but that vesicle-mediated release of ATP may also occur producing the activation of a small proportion of purinergic receptors. This scenario suggests that PA energy metabolism is implicated in the development of insulin resistance through ATP-dependent Ca^{2+} mobilization in neuronal cells and that one of the downstream effectors might be cPKCs in view of the inhibitory effect of BIM on the PA-induced loss of insulin signaling.

Because cPKCs are activated by a rise in intracellular Ca^{2+} ,⁶⁸ it is feasible to assume that the PA-mediated Ca^{2+} increase results in cPKC activation, which in turn negatively modulates the insulin/PI3K/Akt pathway through IRS-1 phosphorylation^{11,69,70} given that BIM reverted the inhibition of PA on insulin effects and because PA regulates the activation and cPKC α in a Ca^{2+} -dependent manner.

Inhibition of mTOR with rapamycin was also found to reverse the effects of PA on insulin signaling. mTOR is the main regulator of cell metabolic responses and negatively modulates the insulin/PI3K/Akt pathway.⁷¹ As activation of mTORC1 is influenced by the intracellular concentration of ATP,⁴⁸ the increased ATP levels after neuronal exposure to PA could activate mTORC1 and thus participates in the inhibition of insulin signaling, as suggested by the experiments with rapamycin.

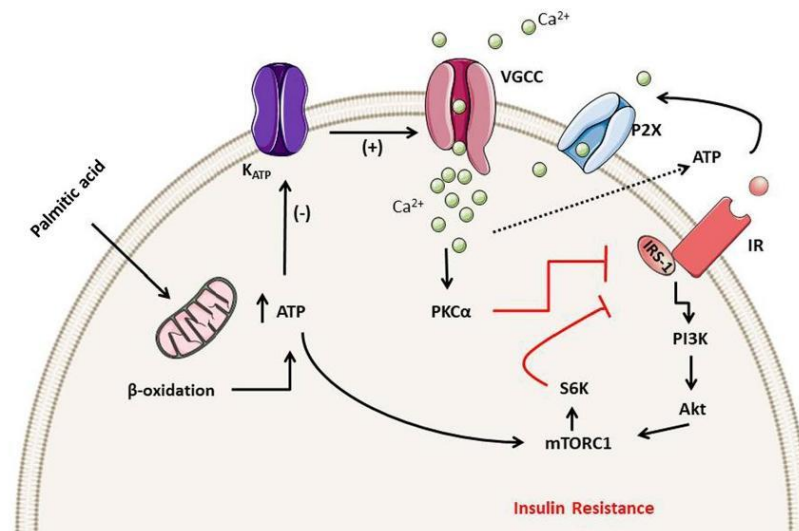


FIGURE 6 Proposed mechanisms of PA-induced impairment of insulin signaling in neuronal cells. The ATP produced by PA metabolism, closes K_{ATP} channels and activates purinergic receptors at the cell surface leading to an increase in free cytosolic Ca^{2+} levels, activation of PKC α and reduced insulin sensitivity. ATP activates the energy sensing kinase mTORC1, which may also alter insulin signaling

Taken together, the present results allow us to propose a novel mechanism for how PA increases ATP levels, produce Ca^{2+} dyshomeostasis, and prevents insulin signaling, (Figure 6). Interestingly, altered Ca^{2+} homeostasis has been largely associated with brain aging and brain pathologies,⁷² which can be one of the detrimental consequences of high and chronic consumption of saturated fatty acids.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Patricia Ferrera and Alicia Sampieri for technical assistance. This work was supported by UNAM, DGAPA, PAPIIT grant number IN202318, and CONACYT grant number A1-S9559. C. Sánchez-Alegría is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a fellowship from CONACYT 597751. LV is a recipient of a Fulbright-García Robles fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CA conceived, designed and coordinated the study. KS-A designed and performed experiments. CEB-E conducted part of the Ca^{2+} experiments. LV provided expertise, resources and supervised Ca^{2+} mobilization studies. CA and KS-A wrote and edited the paper.

REFERENCES

- Grant WB. Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *J Alzheimer's Dis JAD*. 1999;1(4-5):197-201. <https://doi.org/10.3233/jad-1999-14-501>
- Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis*. 2014;67:79-87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.011>
- Busquets O, Eitcheho M, Pallàs M, et al. Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of β -amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice. A potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2017;162:38-45. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.11.002>
- Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, et al. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: a nontargeted metabolomic study. *PLoS Medicine*. 2017;14(3):e1002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002266>
- Chudoba C, Wardelmann K, Kleinridders A. Molecular effects of dietary fatty acids on brain insulin action and mitochondrial function. *Biol Chem*. 2019;400(8):991-1003. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0477>
- McLean FH, Campbell FM, Langston RF, et al. A high-fat diet induces rapid changes in the mouse hypothalamic proteome. *Nutr Metab (Lond)*. 2019;16(1):26. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0352-9>
- Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav*. 2011;103(1):10-16. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.010>
- Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(6):1001-1008. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>
- Liu Z, Patil I, Sancheti H, Yin F, Cadenas E. Effects of lipoic acid on high-fat diet-induced alteration of synaptic plasticity and brain glucose metabolism: a PET/CT and ^{13}C -NMR Study. *Sci Rep*. 2017;7(1):5391. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05217-z>
- Spinelli M, Fusco S, Mainardi M, et al. Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nat Commun*. 2017;8(1):2009. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02221-9>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200958200>
- Lam T, Yoshii H, Haber C, et al. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(4):E682-E691. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00038.2002>
- Ruddock MW, Stein A, Landaker E, et al. Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. *J Biochem*. 2008;144(5):599-607. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn105>
- 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):E1003-E1012. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90377.2008>
- Gao D, Nong S, Huang X, et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*. 2010;285(39):29965-29973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128694>
- Pereira S, Alvarez-Leite J. Low-grade inflammation, obesity, and diabetes. *Curr Obes Rep*. 2014;3(4):422-431. <https://doi.org/10.1007/S13679-014-0124-9>
- Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2577-2589. <https://doi.org/10.1172/JCI36714>
- Mayer CM, Belsham DD. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2010;151(2):576-585. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1122>
- Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(7):1402-1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.004>
- Calvo-Ochoa E, Sánchez-Alegría K, Gómez-Inclán C, Ferrera P, Arias C. Palmitic acid stimulates energy metabolism and

- inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: the role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem Int.* 2017;110:75-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>
21. Hernández-Cáceres MP, Toledo-Valenzuela L, Díaz-Castro F, et al. Palmitic acid reduces the autophagic flux and insulin sensitivity through the activation of the free fatty acid receptor 1 (FFAR1) in the hypothalamic neuronal cell line N43/5. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(e1789418):1-13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00176>
 22. Benomar Y, Naour N, Aubourg A, et al. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2006;147(5):2550-2556. <https://doi.org/10.1210/EN.2005-1464>
 23. Pearson-Leary J, Jahagirdar V, Sage J, McNay EC. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav Brain Res.* 2018;338:32-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.033>
 24. Cheng CM, Mervis RF, Niu S-L, et al. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J Neurosci Res.* 2003;73(1):1-9. <https://doi.org/10.1002/jnr.10634>
 25. Sun X, Yao H, Douglas RM, Gu XQ, Wang J, Haddad GG. Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *J Neurochem.* 2010;112(2):377-388. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06450.X>
 26. Chiu S, Cline H. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 2010;5(7):1-18. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-5-7>
 27. McNay EC, Recknagel AK. Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;96(3):432-442. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.08.005>
 28. Zhao W, Chen H, Xu H, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34893-34902. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34893>
 29. Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(11):660-671. <https://doi.org/10.1038/nrn4019>
 30. Sánchez-Alegría K, Flores-León M, Avila-Muñoz E, Rodríguez-Corona N, Arias C. PI3K signaling in neurons: A central node for the control of multiple functions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3725. <https://doi.org/10.3390/ijms19123725>
 31. Flores-León M, Pérez-Domínguez M, González-Barrios R, Arias C. Palmitic acid-induced NAD⁺ depletion is associated with the reduced function of SIRT1 and increased expression of BACE1 in hippocampal neurons. *Neurochem Res.* 2019;44(7):1745-1754. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02810-8>
 32. Nalez K, Miecz D, Berezowski V, Cecchelli R. Carnitine: transport and physiological functions in the brain. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):551-567. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.001>
 33. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, et al. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2008;283(11):6878-6885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707965200>
 34. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11303-11311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211495200>
 35. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature.* 2003;422(6928):173-176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
 36. Itoh Y, Hinuma S. GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic β cells, regulates insulin secretion. *Hepatol Res.* 2005;33(2):171-173. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.09.028>
 37. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the β cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(1):97-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.042>
 38. Schnell S, Schaefer M, Schöfl C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;263(1-2):173-180. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.09.013>
 39. Zamarbide M, Etayo-Labiano I, Ricobaraza A, et al. GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. *Hippocampus.* 2014;24(7):733-739. <https://doi.org/10.1002/hipo.22263>
 40. Kim JY, Lee HJ, Lee S-J, et al. Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid- β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 α and Akt/NF- κ B pathways. *Sci Rep.* 2017;7(1):4335. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04175-w>
 41. Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, et al. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1986;76(3):375-387. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3456456>
 42. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 2002;75(3):991-1003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x>
 43. Hromadkova L, Bezdekova D, Pala J, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(9):118737. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118737>
 44. Clore JN, Allred J, White D, Li J, Stillman J. The role of plasma fatty acid composition in endogenous glucose production in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2002;51(11):1471-1477. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.35202>
 45. Liu D, Bordicchia M, Zhang C, et al. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1704-1716. <https://doi.org/10.1172/JCI83532>
 46. Alfonso-Méndez M, Carmona-Rosas G, Hernández-Espinosa D, Romero-Ávila M, García-Sáinz J. Different phosphorylation patterns regulate α 1D-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(6):842-854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>
 47. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 48. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science.* 2001;294(5544):1102-1105. <https://doi.org/10.1126/science.1063518>
 49. Moschella PC, Rao VU, McDermott PJ, Kuppaswamy D. Regulation of mTOR and S6K1 activation by the nPKC isoforms, PKCepsilon and PKCdelta, in adult cardiac muscle cells.

- J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(6):754-766. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.09.015>
50. Ribeiro MC, Peruchetti DB, Silva LS, et al. LPS Induces mTORC1 and mTORC2 activation during monocyte adhesion. *Front Mol Biosci.* 2018;5:67. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00067>
 51. Jo Y-H, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S Jr. Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J Neurophysiol.* 2009;101(5):2305-2316. <https://doi.org/10.1152/jn.91294.2008>
 52. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1471-1483. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-6497-0>
 53. Reynoso R, Salgado LM, Calderón V. High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Biochem.* 2003;246(1/2):155-162. <https://doi.org/10.1023/A:1023423005187>
 54. Chavez JA, Summers SA. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012;15(5):585-594. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.002>
 55. Takahashi S, Iizumi T, Mashima K, Abe T, Suzuki N. Roles and regulation of ketogenesis in cultured astroglia and neurons under hypoxia and hypoglycemia. *ASN Neuro.* 2014;6(5):1-14. <https://doi.org/10.1177/1759091414550997>
 56. Melo H, Seixas da Silva G, Sant'Ana M, et al. Palmitate is increased in the cerebrospinal fluid of humans with obesity and induces memory impairment in mice via pro-inflammatory TNF- α . *Cell Rep.* 2020;30(7):2180-2194.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.072>
 57. Grapov D, Adams SH, Pedersen TL, Garvey WT, Newman JW. Type 2 diabetes associated changes in the plasma non-esterified fatty acids, oxylipins and endocannabinoids. *PLoS One.* 2012;7(11):e48852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048852>
 58. Dhopeswarkar G, Mead J. Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. *Adv Lipid Res.* 1973;11:109-142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-024911-4.50010-6>
 59. Pilitsis J, Diaz F, Wellwood J, et al. Quantification of free fatty acids in human cerebrospinal fluid. *Neurochem Res.* 2001;26(12):1265-1270. <https://doi.org/10.1023/A:1014227231130>
 60. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-22. <https://doi.org/10.1155/2014/472459>
 61. Lam T, Schwartz G, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):579-584. <https://doi.org/10.1038/NN1456>
 62. McFadden JW, Aja S, Li Q, et al. Increasing fatty acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS One.* 2014;9(12):e115642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115642>
 63. Schönfeld P, Reiser G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(10):1493. <https://doi.org/10.1038/JCBFM.2013.128>
 64. Choi S-E, Kim H-E, Shin H-C, et al. Involvement of Ca²⁺-mediated apoptotic signals in palmitate-induced MIN6N8a beta cell death. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;272(1-2):50-62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.04.004>
 65. Kishore P, Boucai L, Zhang K, et al. Activation of KATP channels suppresses glucose production in humans. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4916. <https://doi.org/10.1172/JCI58035>
 66. Huopio H, Shyng S-L, Otonkoski T, Nichols CG. K ATP channels and insulin secretion disorders. *Am J Physiol Metab.* 2002;283(2):E207-E216. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00047.2002>
 67. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002;82(4):1013-1067. <https://doi.org/10.1152/PHYSR.EV.00015.2002>
 68. Lipp P, Reither G. Protein kinase C: the "masters" of calcium and lipid. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):a004556. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004556>
 69. Sampson SR, Cooper DR. Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. *Mol Genet Metab.* 2006;89(1-2):32-47. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.017>
 70. Liu M, Clarke CJ, Salama MF, Choi YJ, Obeid LM, Hannun YA. Co-ordinated activation of classical and novel PKC isoforms is required for PMA-induced mTORC1 activation. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184818>
 71. Ardestani A, Maedler K. mTORC1 and IRS1: another deadly kiss. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(11):737-739. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.07.003>
 72. Kumar A, Bodhinathan K, Foster TC. Susceptibility to calcium dysregulation during brain aging. *Front Aging Neurosci.* 2009;1(2):1-13. <https://doi.org/10.3389/NEURO.24.002.2009>

How to cite this article: Sánchez-Alegría K, Bastián-Eugenio CE, Vaca L, Arias C. Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal cells. *The FASEB Journal.* 2021;35:e21712. <https://doi.org/10.1096/fj.202100243R>