



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“Papel del metabolismo energético y la inhibición de Sirtuina 1 en la  
expresión de marcadores de la Enfermedad de Alzheimer.”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
MANUEL FLORES LEÓN

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Félix Recillas Targa  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Rudolf Marinus Buijs  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. Agosto, 2016.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN202615). Manuel Flores León fue un estudiante del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas UNAM y apoyado por CONACyT 631566.

Se agradece el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir a la reunión anual de la Society for Neuroscience “Neuroscience 2015” llevada a cabo del 17 al 21 de Octubre del 2015 en Chicago, Illinois, Estados Unidos.

A la Dra. Clorinda Arias por aceptarme en su laboratorio y brindarme una total confianza y apoyo incondicional durante este tiempo para realizar cada una de las cosas que me pasaban por la cabeza; por el gran ejemplo como investigadora, maestra y persona, gran parte de mi formación se la debo y agradezco. Mejor tutor y guía no pude haber elegido.

A los miembros de mi comité tutor, Dr. Félix Recillas Targa y Dr. Rudolf Marinus Buijs, por todo el apoyo brindado y los consejos que contribuyeron a mi formación académica y que permitieron enriquecer este proyecto.

A la Q.F.B. Patricia Ferrera, la Dra. Angélica Zepeda y la Biol. Sandra Hernández por cada uno de sus acertados consejos dentro del laboratorio que me ayudaron a comprender mucho mejor el proyecto, las técnicas y que fueron un pilar importante en mi formación académica.

A cada miembro del laboratorio, César, Martha, Abril, Liz, Rodrigo, Pamela, Eva, Andrea, Fer, Kari, Nelly, Gibrán, Sinai, Iker, por hacer de estos años un experiencia inolvidable tanto académica como personal.

A Rodrigo González, por tus consejos, tu guía y sobre todo tu amistad. Eres un gran ejemplo tanto académico y profesional como personal. ¡Te admiro mucho!

A la MVZ. Georgina Díaz y al MVZ. Jorge Rebollar por todo el apoyo brindado y la orientación sobre la obtención de ratas preñadas así como la ayuda para solucionar las situaciones adversas. Gracias a ustedes este trabajo pudo llevarse a cabo en tiempo y forma.

## **DEDICATORIAS**

A la mejor mujer que la vida me pudo poner en el camino desde mi primer respiro, latido y señal eléctrica, mi madre. Este trabajo es el fruto de tu gran ejemplo, tu incondicional amor y todo el apoyo a cada una de mis decisiones y locuras. Ten por seguro que esta persona que soy te la debo enteramente a ti.

A mi familia, Tía Rosa, Ana, Polo, Ileana, Ange, Sebas, Aran, Luis y Esther, por su gran ejemplo como personas y alentarme a seguir mis sueños en todo momento.

A mis amigos, Lauris, Jorge, Pau, Fabby, Alme, David y Ale por todo el apoyo brindado, el impulso que me dan a seguir adelante, el cariño y apoyo... aunque estamos lejos, siempre están en mi corazón. Gracias por estos casi 15 años de amistad.

A Fernando, Maricris, Sofi, Pavel, Ana Isa, Selene y Fer Mr Math por las risas y quitarme el estrés con cada uno de sus mensajes y pláticas. Siempre aprendo mucho de cada uno de ustedes.

A mis amigos, Porrín, Angie, Eunice, Jorge, Luis, Pilar, Said y Andrés, por darme siempre una palabra de aliento cuando sentía que no lograba terminar. Son un gran ejemplo para mí y agradezco que la vida me dejara conocerlos y aprender mucho de cada uno de ustedes.

Al club del fondue, porque en cada una de las decisiones y pasos que di estuvieron a mi lado y porque con su incondicional apoyo jamás me dejaron caer cuando el camino se veía difícil y tambaleaba. Su “warmth” me ayudó a concretar este reto y sueño. Siempre tendrán mi cariño y apoyo incondicional.

*“Don’t let the fear of striking out, keep you from playing the game”*

## **ABREVIATURAS**

ADAM10: A Disintegrin And Metalloproteinase domain 10.  
AP: Ácido palmítico.  
APP: Amyloid Precursor Protein.  
ART: ADP-ribosyl Transferases.  
ATP: Adenosine triphosphate.  
A $\beta$ : Amyloid- $\beta$ .  
BACE-1:  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1.  
Bace1-AS:  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 Anti-Sense.  
BSA: Bovine Serum Albumin.  
cADPR: Cyclic ADP-Ribose.  
CTF: C Terminal Fragment.  
DAG: Diacilglicerol.  
DIV: Días *In Vitro*.  
DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2.  
EA: Enfermedad de Alzheimer.  
FOXO3: Forkhead box O 3.  
FWD: Forward.  
Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase.  
H3K9ac: Acetilación de la lisina 9 de la histona 3.  
H3K9me3: Trimetilación de la lisina 9 de la histona 3.  
HDAC: Histone Deacetylase.  
HFD: High Fat Diet.  
JNK1: c-Jun Terminal Kinase 1.  
K310ac: Acetilación de la lisina 310.  
lncRNA: Long non-coding RNA.  
miRNA: Micro RNA.  
MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide.  
NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide adenine dinucleotide, en su forma oxidada.  
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide, en su forma reducida.  
ncRNA: Non-coding RNA.  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.  
PARP: Poly ADP ribose polymerase.  
PBS: Phosphate-Buffered Saline.  
PCG1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha.  
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor.  
qRT-PCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.  
RAR $\beta$ : Retinoic acid receptor beta.  
REV: Reverse.  
Sirts: Sirtuinas.  
SREBP: Sterol regulatory element-binding protein.  
TBS: Tris-buffered saline.  
TLR4: Toll-like receptor 4.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
2.1 SENSORES ENERGÉTICOS Y METABOLISMO CELULAR .....	8
2.2 DIETAS ALTAS EN GRASA Y EL ÁCIDO PALMÍTICO.....	11
2.3 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP). .....	12
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>15</b>
<b>4. PREGUNTA PROBLEMA .....</b>	<b>15</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>7. OBJETIVOS PARTICULARES. ....</b>	<b>15</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>8.1 CULTIVO CELULAR .....</b>	<b>16</b>
8.1.1 SOLUCIONES UTILIZADAS .....	17
<b>8.2 TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO .....</b>	<b>18</b>
<b>8.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD OXIDO-REDUCTORA MITOCONDRIAL (REDUCCIÓN DE MTT) .....</b>	<b>18</b>
<b>8.4 CUANTIFICACIÓN DE LA RELACIÓN NAD<sup>+</sup>/NADH .....</b>	<b>18</b>
<b>8.5 WESTERN BLOT.....</b>	<b>19</b>
8.5.1 TABLA DE ANTICUERPOS .....	19
<b>8.6 qRT-PCR.....</b>	<b>20</b>
8.6.1 SECUENCIAS DE LOS PRIMERS .....	21
<b>8.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>21</b>
<b>9 RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
9.1 ACTIVIDAD OXIDO-REDUCTORA MITOCONDRIAL .....	22
9.2 RELACIÓN NAD <sup>+</sup> /NADH .....	23
9.3 EFECTOS DEL AP EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE SIRT1 .....	23
9.4 EFECTO DEL AP EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL PROCESAMIENTO DE LA APP.....	25

<b>9.5 EFECTO DEL INHIBIDOR EX527 EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE SIRT1 .....</b>	<b>28</b>
<b>9.6 EFECTO DEL EX527 EN PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL PROCESAMIENTO DE LA APP. ....</b>	<b>30</b>
<b><u>10. DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>11. CONCLUSIONES.....</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b><u>12. REFERENCIAS .....</u></b>	<b><u>43</u></b>

## **1. RESUMEN**

Las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de dietas altas en grasa (HFD) se consideran como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, incluida la Enfermedad de Alzheimer (EA). Algunos de los efectos adversos de las HFD se atribuyen al alto contenido de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (AP). Se sugiere que el AP pudiera afectar el metabolismo energético celular modulando el contenido de NAD<sup>+</sup>/NADH. Aunado a esto, la actividad de un grupo de Desacetilasas de Histonas (Clase III – Sirtuinas) pudiera ser modificada mediante el metabolismo energético dado que utilizan al NAD<sup>+</sup> como cofactor. La Sirtuina 1 (Sirt1) es responsable de la desacetilación de una gran cantidad de proteínas citoplasmáticas, factores de transcripción y residuos en el N-terminal de las histonas, generando una activación o represión de diferentes genes. Sin embargo, los mecanismos que relacionan la ingesta de HFD, alteraciones en el metabolismo energético y la expresión de marcadores de la EA no se han elucidado por completo. En la presente tesis se analizó el efecto que genera el AP sobre la función de Sirt1, la relación con el cambio en la acetilación de NF-κB y con la expresión de las enzimas limitantes del procesamiento de la Proteína Precursora del Amiloide (APP), Bace-1 y Adam10. Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo expuestos a diferentes concentraciones de AP o EX527 (inhibidor específico de Sirt1), seguido de una extracción de proteína y RNA para su análisis por Western Blot y RT-qPCR. La cuantificación de NAD<sup>+</sup>/NADH se realizó con un kit colorimétrico. Nuestros resultados muestran que los cultivos de neuronas de hipocampo disminuyen el contenido de NAD<sup>+</sup>/NADH cuando son expuestos a dosis no neurotóxicas de AP. Además, la actividad de Sirt1, asociada a la disminución de NAD<sup>+</sup>/NADH, se ve comprometida reflejado en el aumento en la acetilación de NF-κB. Respecto a las enzimas limitantes, el contenido proteico de Adam10 y Bace-1 aumentan cuando las neuronas de hipocampo son expuestas a AP, sugiriendo una posible alteración en el procesamiento de la APP. Los resultados muestran que una exposición a AP altera el metabolismo energético neuronal y que esta disminución en la cantidad de NAD<sup>+</sup> se asocia a un decremento en la función de Sirt1. Esta alteración en la actividad de Sirt1 pudiera tener un impacto en la expresión de marcadores de la EA como la activación de NF-κB y un aumento del procesamiento de la APP mediante Bace-1.



## **2. INTRODUCCIÓN**

A través de diferentes aspectos del metabolismo energético celular, los organismos pueden mantener su estructura, realizar funciones básicas, reparar daños y en general, responder ante estímulos ambientales manteniendo la homeostasis mediante un conjunto de reacciones químicas a partir de nutrientes. El mantenimiento de la homeostasis celular se convierte en un aspecto fundamental que permite regular y adaptarse a los cambios ambientales a los que un organismo se expone constantemente.

La complejidad de los mecanismos, hormonales, celulares y moleculares que regulan el metabolismo energético en los mamíferos, permite responder con eficacia a los cambios en sus demandas de energía y mantener la función celular en condiciones óptimas. Sin embargo, el desbalance entre el aporte de nutrientes y su consumo produce alteraciones metabólicas que conducen a la obesidad, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (DMT2), entre otras. Diversos factores genéticos pueden originar o perpetuar modificaciones metabólicas debido a mutaciones en enzimas, polimorfismos de genes que se asocian con aumento o disminución de la actividad enzimática y cambios en la expresión de proteínas por mecanismos epigenéticos, entre otros.

El principal factor de riesgo para tener alteraciones metabólicas que llevan a la obesidad, DMT2 y resistencia a la insulina es la ingesta de dietas altas en grasas y azúcares procesadas, aunado a un estilo de vida sedentario. El consumo de estas dietas y estilo de vida ha incrementado durante los últimos años en las sociedades occidentales de forma alarmante. El cerebro es particularmente sensible a cambios en el metabolismo energético ya que es un órgano de gran plasticidad y alta tasa metabólica. Se ha propuesto que la resistencia a la insulina y la DMT2 son condiciones de riesgo epidemiológico para la Enfermedad de Alzheimer (EA).<sup>1</sup> En este sentido, hay muchos estudios que señalan la asociación entre deterioro cognitivo y alteraciones cardiovasculares y metabólicas como la diabetes y el síndrome metabólico. Sin embargo, pocos estudios han abordado el impacto que tiene la exposición a ciertos nutrientes con alto contenido energético sobre la función neuronal y los mecanismos responsables.

### **2.1 SENSORES ENERGÉTICOS Y METABOLISMO CELULAR**

Uno de los mecanismos por el cual las células sensan cambios del estado metabólico es el estado redox (reducción-oxidación) intracelular, particularmente a través del contenido de los dos cofactores más importantes del metabolismo energético, el NAD<sup>+</sup> y NADH.

El balance de la relación NAD<sup>+</sup>/NADH es de suma importancia para llevar a cabo muchas reacciones metabólicas, activación de enzimas, regulación de la expresión genética y mantenimiento del balance redox celular.<sup>2</sup> Es por ello que el balance entre la forma

oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) y la forma reducida ( $\text{NADH}$ ) es crítico para una función celular apropiada y, para su supervivencia.

El metabolito  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido) es una molécula clave para la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y por lo tanto para la fosforilación oxidativa y producción de ATP. Para poder ser útil en la fosforilación oxidativa, el  $\text{NAD}^+$  debe unir un hidrógeno para transformarse en  $\text{NADH}$  y poder transportar los protones y electrones a esta ruta de síntesis de ATP. Además es un cofactor clave de varias enzimas.<sup>2</sup>

Entre las enzimas que utilizan  $\text{NAD}^+$  como cofactor, se encuentran las ADP-ribosil transferasas (ARTs) y poli-ADP-ribosil transferasas (PARPs), las ADP-ribosil cíclico sintasas (cADPR) y a las Sirtuinas (Sirts).<sup>3</sup>

Las Sirts se clasifican como desacetilasas de histona clase III (HDAC III); esta clasificación debida a que utilizan  $\text{NAD}^+$  y no Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), como las otras clases (HDAC I, II, IV), para poder desacetilar a sus blancos proteicos (imagen 1). El utilizar este metabolito como cofactor las hace sensibles a los cambios energéticos en la célula y por tanto un sensor metabólico importante para la célula.

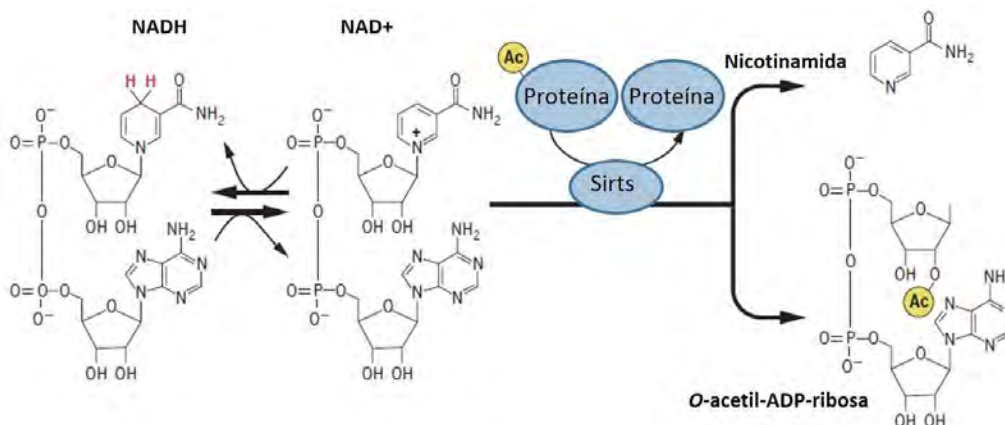
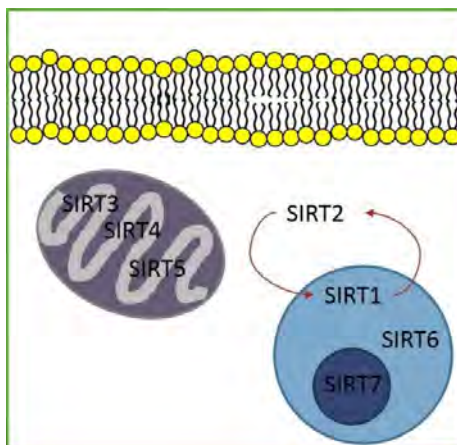


Imagen 1 Estructura del NAD en su forma reducida ( $\text{NADH}$ ) y en su forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ). Las Sirts remueven grupos acetilo de una gran variedad de proteínas. Esta reacción está acoplada al rompimiento del  $\text{NAD}^+$  en nicotinamida y ADP-ribosa, la cual sirve como aceptor del grupo acetilo. (Modificado de Verdin, E. 2015).

Este grupo de proteínas se encuentra altamente conservado entre las diferentes especies y en mamíferos existen 7 (Sirt 1-7). Su distribución en diferentes compartimentos celulares (imagen 2) hace que tengan una gran variedad de blancos y funciones biológicas. Entre algunos de sus blancos se encuentran proteínas y factores de transcripción como: FOXO3, SREBP, PCG1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, p53, Tau, Akt, p300/CBP.<sup>4-6</sup> Dada su amplia gama de proteínas blanco, sus funciones varían desde reguladores de proteínas estructurales o de vías de señalización como Tau o Akt hasta reguladores de la transcripción de genes

mediante la activación o inactivación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o p53 y por su interacción directa con residuos específicos en la región N-terminal de las histonas.<sup>7</sup>



*Imagen 2 Ubicación intracelular de las Sirts. La Sirt1 y Sirt2 pueden translocarse de citoplasma a núcleo y viceversa ante señales específicas de ciclo celular o estrés celular; esto hace que sean las más estudiadas. Sirt3, Sirt4 y Sirt5 se encuentran exclusivamente en mitocondria. Sirt6 se activa ante daños al DNA. Sirt7 se encuentra regulando genes ribosomales por su localización específica en el nucléolo.*

Entre las principales funciones de las Sirts se encuentran regular y sensor el estado energético, evitar envejecimiento patológico y el aumento de la longevidad por restricción calórica en diferentes organismos.<sup>5,8-10</sup> La restricción calórica es una condición en la que se evita el consumo excesivo de carbohidratos y lípidos. Diferentes grupos han reportado un incremento en la expresión y actividad de algunas Sirts en diferentes tejidos, particularmente de la Sirt1, cuando se exponen a una dieta de restricción calórica.<sup>8,9,11</sup> Por el contrario, grupos enfocados al estudio de los efectos del consumo de dietas altas en grasa (HFD) han demostrado que estas dietas, opuestas a la restricción calórica, genera una reducción en la función y expresión de la Sirt1, asociado con el alto contenido de glucosa, fructosa y ácidos grasos saturados.<sup>5,7,8,12</sup>

Se ha reportado que las HFD afectan la cantidad de NAD<sup>+</sup> disponible en los pozos celulares.<sup>13</sup> Esta cantidad es directamente proporcional a la actividad de las Sirts, cuando disminuye el NAD<sup>+</sup> la actividad de esta clase de HDACs disminuye.<sup>14-16</sup> Dada esta estrecha relación entre el balance NAD<sup>+</sup>/NADH y las Sirts, una modificación al balance tiene un gran impacto en la actividad de las Sirts teniendo grandes repercusiones en varios procesos celulares.

Uno de los órganos que es altamente susceptible a la ingesta de nutrientes es el cerebro, debido a la gran demanda energética y de nutrientes que requiere para realizar sus funciones. La Sirt1 se expresa de manera diferencial en las regiones del sistema nervioso central, sugiriendo un papel importante en la regulación de las funciones específicas de cada estructura. Se ha reportado que entre las regiones con mayor expresión se encuentran

los diferentes núcleos del hipotálamo, el cerebelo, el núcleo del tracto solitario y el hipocampo;<sup>17</sup> este último implicado en procesos de memoria y aprendizaje y altamente plástico y susceptible a daños.

Heyward y colaboradores, cuantificaron la cantidad (proteína y mRNA) y actividad de Sirt1 en el hipocampo de ratones sometidos a HFD respecto a una dieta control. Ellos reportan una disminución en la cantidad de proteína y mRNA así como un aumento en la acetilación de p53, un blanco específico de Sirt1 sugiriendo una disminución en su actividad. Adicional a estas cuantificaciones, sometieron a los ratones a una tarea de reconocimiento de objeto novedoso y reportaron una disminución en la exploración y reconocimiento del objeto. Los autores correlacionan el deterioro cognitivo con la disminución en la cantidad y actividad de Sirt1 generado por la ingesta de HFD.<sup>18</sup>

A pesar de tener claras evidencias sobre la importancia del NAD<sup>+</sup> para la función de Sirt1, poco se sabe sobre los mecanismos exactos por los cuales el NAD<sup>+</sup> puede disminuirse en estructuras tan complejas como el cerebro. Sin embargo, una de estas condiciones que han tomado importancia y que se han relacionado a las alteraciones en el metabolismo energético y la expresión y función de Sirt1 es el consumo de HFD y particularmente uno de sus componentes: el ácido palmítico (AP).

## 2.2 DIETAS ALTAS EN GRASA Y EL ÁCIDO PALMÍTICO

En años recientes el estudio de los efectos metabólicos por el consumo de HFD ha ganado gran interés ante los grupos de investigación por generar condiciones metabólicas asociadas a patologías crónico-degenerativas como obesidad, síndrome metabólico, DMT2 y resistencia a la insulina.<sup>19</sup> Estas dietas se caracterizan por tener un alto contenido de ácidos grasos saturados. A pesar de que la composición de las HFD es compleja, el alto contenido en colesterol y ácidos grasos saturados parece ser el responsable de sus efectos deletéreos. En particular, el componente al cual se le han atribuido la mayor parte de los cambios metabólicos, celulares y moleculares que estas dietas generan es el AP, además de ser el de mayor abundancia en estas dietas (3.3%).

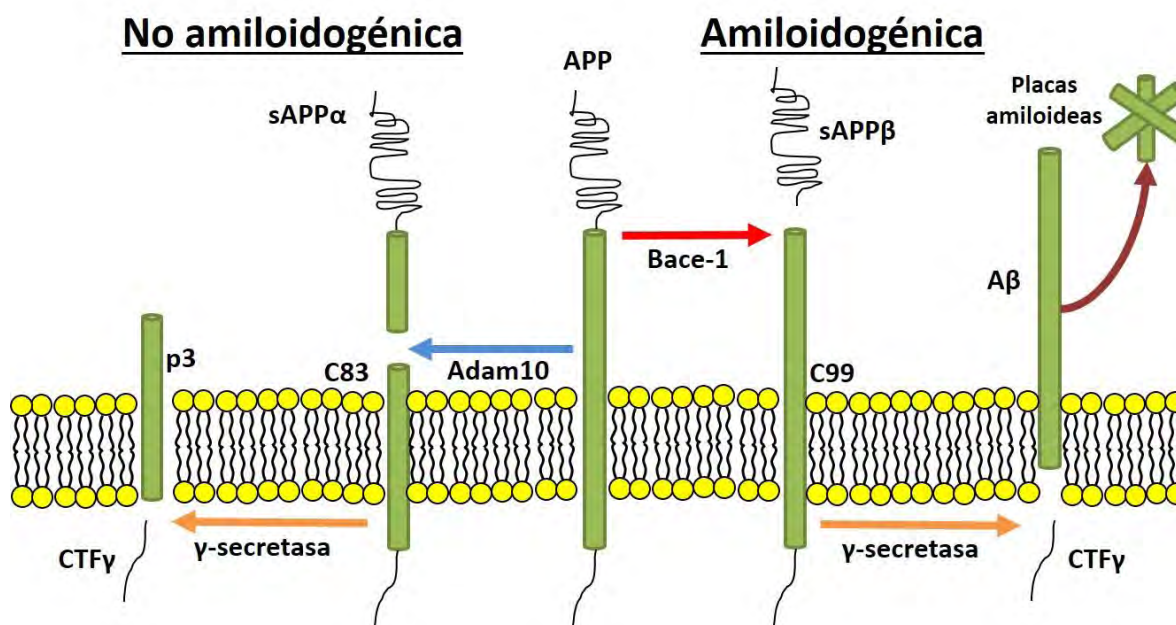
El AP es un ácido graso saturado de 16 carbonos que puede ser utilizado por la mayoría de las células como molécula energética. Hasta la fecha no existen reportes claros sobre el uso de esta molécula como fuente energética por las neuronas ya que se debate su paso a través de la barrera hematoencefálica y la oxidación en mitocondrias neurales.<sup>20</sup>

En diferentes modelos experimentales se ha observado que el AP correlaciona con alteraciones en vías de señalización, disminución en factores de transcripción y otras proteínas, entre ellas Sirt1.<sup>21-23</sup> Estos resultados sugieren que la posible inhibición de Sirt1 por el consumo de HFD podría deberse a la presencia y alto contenido de AP.

El mecanismo por el cual el AP genera alteraciones en proteínas y vías de señalización no ha sido elucidado por completo. Sin embargo, diferentes grupos de estudio lo han asociado con alteraciones en la vía de señalización de insulina cerebral, con cambios morfológicos en estructuras relacionadas con memoria y aprendizaje como el hipocampo, disminución en marcadores sinápticos y la aparición marcadores de envejecimiento patológico como los de la EA.<sup>19,24,25</sup> Entre estos marcadores se encuentra el aumento en el número de placas amiloides<sup>24,26-28</sup> debido a un procesamiento alterno de la Proteína Precursora del Amiloide (APP, por sus siglas en inglés) y la hiperfosforilación de la proteína Tau generando las marañas neurofibrilares.<sup>19,25,29</sup>

### 2.3 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP).

La APP es una proteína transmembranal que se ha visto implicada en el crecimiento y sobrevivencia neuronal, la formación de sinapsis, en los procesos de memoria y aprendizaje, entre otros.<sup>30</sup> Esta proteína puede ser procesada por dos vías (imagen 3) dando como resultados diferentes fragmentos implicados en funciones neuronales de sobrevivencia o en neurodegeneración.



*Imagen 3 Procesamientos de la APP. La vía no amiloidogénica es iniciada por la α-secretasa Adam10 mientras que la vía amiloidogénica es iniciada por la β-secretasa Bace-1. En ambos procesamientos participa el complejo de la γ-secretasa. Sin embargo, uno genera péptidos solubles neurotróficos (vía no amiloidogénica) mientras que el otro genera péptidos no solubles que se agregan formando las placas amiloides (vía amiloidogénica) implicadas en neurodegeneración.*

El procesamiento no patológico (no amiloidogénico) inicia por el corte de una α-secretasa, llamada ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase domain 10, por sus siglas en inglés), generando el fragmento sAPPα y el fragmento C83 (CTFα). Este último fragmento es procesado por el complejo de la γ-secretasa (Presenilina 1, Presenilina 2, Nicastrina y

Aph-1) generando el fragmento p3 y el CTF- $\gamma$ .<sup>31</sup> El fragmento sAPP $\alpha$  es al que se le atribuyen los efectos neuroprotectores y de sobrevivencia que se han observado en modelos que sobreexpresan la APP.<sup>30,32,33</sup>

Existe un procesamiento alternativo (vía amiloidogénica) llevado a cabo por la  $\beta$ -secretasa BACE-1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1, por sus siglas en inglés). Este corte genera un fragmento sAPP $\beta$  y un fragmento C99 (CTF $\beta$ ). El fragmento C99 es procesado por el complejo de la  $\gamma$ -secretasa generando el péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ <sub>40-42</sub>). El fragmento A $\beta$ <sub>40-42</sub>, al ser no soluble, se agrega en el espacio extracelular formando las placas amiloides.<sup>31</sup> Aunado a esto, diferentes grupos de investigación han reportado que el fragmento sAPP $\beta$  puede ser procesado una vez más para generar un fragmento de 35 KDa (N-APP) que puede unirse al receptor DR6 activando a la caspasa 6 para inducir apoptosis en neuronas mediante la poda de axones colaterales ("*Axonal pruning*").<sup>34,35</sup> Así estos dos fragmentos contribuyen a la neurodegeneración observada por el aumento en el procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica.<sup>30,36</sup>

Estudios epidemiológicos han demostrado una fuerte correlación entre el consumo de HFD y la aparición de marcadores de EA como las placas amiloides.<sup>28,37,38</sup> Diferentes grupos han realizado estudios de memoria y aprendizaje en ratones sometidos a una HFD con el laberinto acuático de Morris. Estos grupos demostraron como la exposición a este tipo de dietas disminuye el desempeño en la tarea respecto al grupo control, sugiriendo que las HFD disminuyen la capacidad cognitiva asociado al aumento en el número de placas amiloides.<sup>24,39</sup>

Además se ha reportado una disminución de la expresión y actividad de Sirt1 en diferentes modelos de envejecimiento y de la EA y que se exacerba con la ingesta de HFD.<sup>39-42</sup> Estos reportes, en conjunto con aquellos de las HFD y AP sobre la aparición de placas amiloides, el deterioro cognitivo y la disminución en la expresión y función de Sirt1 sugiere una correlación entre el metabolismo energético sensado por Sirt1 para regular funciones neuroprotectoras y evitar un envejecimiento patológico.

Por otro lado, estudios realizados en modelos *in vivo* e *in vitro* reportan un aumento en la cantidad de proteína y actividad de proteínas implicadas en el procesamiento amiloidogénico, como Bace-1, después de ser sometidos a HFD.<sup>43,44</sup> Particularmente, los estudios *in vitro* se han realizado en neuronas corticales expuestas a un medio condicionado de astrocitos tratados con AP. En estos experimentos se reporta un aumento de Bace-1 mediante diferentes mecanismos dependientes de proteínas como STAT3 o producción de ceramidas.<sup>45-47</sup> Sin embargo, poco se sabe sobre el papel directo del AP en las neuronas y no a través del metabolismo de los astrocitos.

Respecto a los efectos de HFD sobre el procesamiento no amiloidogénico, Vandal y colaboradores reportaron que tanto los niveles de la APP, del sAPP $\alpha$  y de Adam10 no se modifican.<sup>48</sup> Los efectos en el aumento en la expresión de Adam10 se observan con modelos sometidos a dietas de restricción calórica. De manera interesante, el aumento se genera en la forma madura y en la actividad de Adam10 lo que conduce a un aumento en el fragmento sAPP $\alpha$ .<sup>49</sup> En este mismo estudio realizado en ratones transgénicos sometidos a dietas de restricción calórica no se observan cambios en la cantidad de Bace-1, como los observados con las HFD.<sup>48,49</sup>

Los cambios observados en estas tres proteínas ante las diferentes dietas administradas en modelos *in vivo* y los mecanismos ya descritos en modelos *in vitro*, sugieren una regulación de cada proteína a diferentes niveles (transcripcional, post-transcripcional, post-traducciona y de actividad enzimática).

Se ha reportado que Sirt1 puede activar o inactivar la transcripción de genes implicados en ambos procesamientos de la APP principalmente a través de su interacción con factores de transcripción.<sup>50,51</sup> Algunos de los factores de transcripción que se reportan como blanco de Sirt1 son FOXO3, NF- $\kappa$ B, RAR $\beta$ , SREBP, PCG1 $\alpha$ .<sup>5</sup> Dichos factores de transcripción son importantes para la regulación de genes implicados en inflamación, estrés oxidante, metabolismo, y otros procesos celulares. Estos procesos se activan y se alteran por exposición a HFD, durante el envejecimiento y también se han asociado a la aparición de marcadores de neurodegeneración.<sup>51-54</sup>

Se sabe que Sirt1 se puede reclutar y activar al promotor de *Adam10* mediante la desacetilación del Receptor de Ácido Retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ).<sup>55</sup> En ese mismo estudio reportan que cuando se abate la expresión de Sirt1, se pierde el reclutamiento del complejo al promotor y la expresión de *Adam10* disminuye. Este efecto se ve exacerbado cuando se hace una cruce con un ratón transgénico para la EA. Aunado a esto, observan un aumento en la expresión de *Bace1* y una mayor cantidad de A $\beta$ <sub>40-42</sub>.<sup>55</sup>

Por otro lado, se ha reportado un incremento en la acetilación de las histonas 3 y 4 en el promotor de *Bace-1* así como un incremento en el mRNA durante el envejecimiento y en el modelo triple transgénico para la EA.<sup>56</sup> Además se han caracterizado secuencias de unión de NF- $\kappa$ B en el promotor de *Bace-1*, vinculando su expresión con estrés, inflamación, el envejecimiento y la EA.<sup>52,57</sup>

Estos antecedentes sugieren una desregulación en el equilibrio de las vías del procesamiento de la APP por interacciones con el ambiente como eventos inflamatorios, estrés oxidante, alteraciones metabólicas, etc. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que vinculen a los componentes de la ingesta de HFD, como el AP,

con la regulación de las enzimas implicadas en el procesamiento de la APP y el metabolismo energético neuronal mediado por sensores energéticos como el NAD<sup>+</sup> y la Sirt1.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las dietas con alto contenido de ácidos grasos saturados, como el AP, se asocian con alteraciones en el procesamiento de la APP a través de un aumento de la vía amiloidogénica. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que asocien cambios en el metabolismo energético neuronal con la alteración en el procesamiento de la APP. Un posible mecanismo incluye la inhibición de la Sirt1 capaz de alterar el equilibrio de las proteínas involucradas en el metabolismo de la APP.

### **4. PREGUNTA PROBLEMA**

¿La alteración en la expresión y actividad de la Sirt1 mediada por AP modifica la expresión de genes y proteínas relacionadas con el procesamiento de la APP (Bace1 y Adam10)?

### **5. HIPÓTESIS**

1. El AP inhibe la actividad de Sirt1 al disminuir el NAD<sup>+</sup> neuronal.
2. La inhibición de Sirt1 favorece el procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica incrementando los niveles de Bace-1 y disminuye los de Adam10 en neuronas hipocampales.

### **6. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el efecto del AP y el inhibidor EX527 sobre la función de Sirt1 y expresión de proteínas y genes relacionados con el procesamiento de la APP en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

### **7. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Evaluar cambios en el metabolismo energético causados por AP mediante la relación NAD<sup>+</sup>/NADH y actividad oxido-reductora mitocondrial.
2. Evaluar el efecto por AP y el inhibidor EX527 en la expresión y actividad de Sirt1 mediante la desacetilación de NF-κB.
3. Caracterizar los cambios generados por AP y EX527 en la expresión del mRNA y proteína de Bace1 y Adam10 y en la APP total.



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### *8.1 Cultivo celular*

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron obtenidos a partir de embriones de rata Wistar en el día 16 a 18 de gestación. Se realiza la disección de los embriones, del cerebro y del hipocampo manteniéndolos en solución Krebs. Posteriormente se obtiene una suspensión celular con el siguiente procedimiento:

1. Retirar solución Krebs teniendo cuidado de no aspirar el tejido.
2. Triturar el tejido con una navaja de bisturí hasta disgregar lo mejor posible.
3. Tomar 1 mL de la solución #1 y lavar el tejido. Aspirar solución junto con tejido y depositarlo en 9 mL de la solución #1 contenidos en un tubo Falcon de 15 mL. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto para sedimentar todo el tejido.
4. Aspirar todo el volumen posible de la solución #1 sin deshacer el pellet. Agregar 7 mL de la solución #2 (previamente calentada a 37°C). Deshacer el pellet suavemente por inversión. Calentar a 37 °C por 10 minutos para que actúe la tripsina.
5. Agregar 7 mL de la solución #4 y permitir que durante 5 minutos se detenga la reacción de tripsinización y que la DNAsa I digiera el DNA que se ha liberado. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto.
6. Agregar a un vaso de precipitados con el tamiz 5 mL de la solución #3.
7. Aspirar sobrenadante sin disgregar el pellet. Agregar 1 mL de la solución #3 (tomar del vaso de precipitados con el tamiz) y resuspender el pellet apoyando la punta de la pipeta contra la pared del tubo Falcon para disgregar los cúmulos de células formados cuidadosamente.
8. Aspirar el tejido disgregado y colocarlo de regreso en el vaso de precipitados con el tamiz y la solución #3. Resuspender varias veces para generar una suspensión celular homogénea con ayuda del tamiz.
9. Tomar toda la solución #3 del vaso de precipitados y tamiz (por fuera del tamiz) que ahora contiene la suspensión celular y pasarla a un tubo Falcon nuevo con 5 mL de la solución #5. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
10. Aspirar todo el sobrenadante y resuspender en el volumen de medio deseado para realizar conteo celular y poder realizar la siembra.

Se sembraron las neuronas en cajas de 12 pozos a una densidad de 1 millón de células por pozo y en cajas Petri de 60 mm<sup>3</sup> a una densidad de 6 millones de células por caja previamente tratadas con poli-L-lisina (10 µg/mL en PBS estéril) e incubadas a 37 °C durante 2 horas. Se mantuvieron con medio de cultivo Neurobasal suplementado con 1% B27, 0.5 mM L-Glutamina (Gibco) y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina. Las células se mantuvieron por 12 *in vitro* (DIV) a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>/95% aire.

### 8.1.1 Soluciones utilizadas

Para 50 mL de Solución Krebs (10x)

3.585 g NaCl  
0.18 g KCl  
0.082 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.07 g NaHCO<sub>3</sub>  
1.285 g Glucosa  
0.0075 g Rojo Fenol

Solución #1

10 mL Solución Krebs 10x  
90 mL Agua destilada estéril  
300 mg BSA  
800 µL MgSO<sub>4</sub> 3.8%  
300 µL Penicilina/Estreptomicina

Solución #2

10 mL Solución #1  
2.0 mg Tripsina

Solución #3

10 mL Solución #1  
5.2 mg Inhibidor SBT  
100 µL MgSO<sub>4</sub> 3.8%  
0.8 mg DNAsa I

Solución #4

10.5 mL Solución #1  
2 mL Solución #3

Solución #5

10 mL solución #1  
12 µL CaCl<sub>2</sub> 1.2%  
800 µL MgSO<sub>4</sub> 3.8%

### *8.2 Tratamiento de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo*

A los 12 DIV los cultivos celulares fueron tratados con diferentes concentraciones de AP (150, 200, 300  $\mu$ M) o a diferentes tiempos (12 y 24 horas) con el inhibidor específico de Sirt1 EX527 (50  $\mu$ M). Ambos procedentes de Sigma.

El AP se prepara al momento de ser utilizado a una concentración de 200 mM en 100% etanol. Después se hace una dilución (5 mM) tomando 12.5  $\mu$ L del stock 200 mM en 500  $\mu$ L de PBS/BSA 10%, se incuba a 37 °C hasta disolverse.

El EX527 se prepara al momento de ser utilizado a una concentración de 4 mM en PBS/EtOH (1:1) (1 mg de EX527 por 1 mL de PBS/EtOH). Se deja a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de ser administrado.

### *8.3 Ensayo de actividad oxido-reductora mitocondrial (reducción de MTT)*

Los cultivos celulares se incubaron con 150, 200 o 300  $\mu$ M de AP a los 12 DIV. 24 horas después se les agregó el Tetrazolio MTT (5 mg/mL en PBS estéril) a una concentración 1:10. Se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 800  $\mu$ L de isopropanol ácido (19.2 mL isopropanol con 0.8 mL HCl 1N) para disolver los cristales de formazan. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de cada pozo y se leyeron en un espectrofotómetro a 570 nm por duplicado.

### *8.4 Cuantificación de la relación NAD<sup>+</sup>/NADH*

Para cuantificar la relación NAD<sup>+</sup>/NADH se utilizó un kit colorimétrico de Abcam #ab65348. Brevemente, después de 24 horas del tratamiento con diferentes concentraciones de ácido palmítico (150 y 200  $\mu$ M) se les retiró el medio de cultivo. Se lavaron una vez con PBS frío. Se desechó el PBS y se agregaron 400  $\mu$ L del Buffer de extracción de NAD<sup>+</sup>/NADH. Se hicieron dos ciclos de congelamiento/descongelamiento (20 minutos en hielo seco seguido de 10 minutos a temperatura ambiente). Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorff, se vortexearon por 10 segundos y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos manteniéndolos en hielo. Se tomó una alícuota de 200  $\mu$ L en un tubo nuevo para calentarla a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se preparó la curva estándar como indica el proveedor y se hicieron diluciones de las muestras para realizar las lecturas en placas de ELISA. Se les agregó 100  $\mu$ L del Mix de Enzima NAD cicladora a cada pozo. Se dejó la reacción por 5 minutos. Se agregaron 10  $\mu$ L de la solución reveladora y se dejó incubar de 30 a 90 minutos para su lectura a 450 nm. Cada lectura de la muestra se hizo por duplicado.

### 8.5 Western Blot

Se realizó la extracción de proteínas de los cultivos celulares con buffer de lisis RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, por sus siglas en inglés) o TRIZOL® (LifeTechnologies). Aquellas muestras extraídas con el buffer de lisis RIPA se sonicaron y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. Se cuantificaron las muestras por el método de Lowry modificado (BioRad #500-0114) antes de realizar una SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot® LV PVDF BioRad) previamente hidratada con Metanol y estabilizada en Buffer de Transferencia Towin sin SDS. Se bloqueó la membrana con BSA 5% en TBS – Tween 0.1% toda la noche a 4 °C. Se incubaron los anticuerpos Bace-1 (Cell signaling), NF-κB p65 K310ac (Cell signaling), Adam10 (Abcam), NF-κB p65 (Santa Cruz), SIRT1 (Abcam), APP (Abcam) toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween 0.1%. Se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos Anti-Rabbit HRP IgG y Anti-mouse HRP IgG (Santa Cruz) durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% cada uno de 10 minutos. Se utilizaron placas sensibles a quimioluminiscencia (Kodak) y el kit de Immobilon de Millipore para la detección de la señal. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ®.

#### 8.5.1 Tabla de anticuerpos

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>MARCA</b>	<b>WB (Ac primario)</b>	<b>WB (Ac secundario)</b>
NF-κB p65 K310ac	Anti-conejo (Rabbit)	Cell Signaling (#3045)	1:1000	1:10000
NF-κB p65	Anti-ratón (Mouse)	Santa Cruz (SC-8008)	1:1000	1:10000
BACE-1	Anti-conejo (Rabbit)	Cell Signaling (#5606)	1:2000	1:15000
ADAM10	Anti-conejo (Rabbit)	Abcam (ab124695)	1:1000	1:10000
SIRT1	Anti-ratón (Mouse)	Abcam (ab104833)	1:1000	1:10000
APP	Anti-conejo (Rabbit)	Abcam (ab133509)	1:1000	1:10000
Actina	Anti-ratón (Mouse)	Sigma (A5316)	1:1000	1:10000

Extracción de proteínas por el método de TRIzol: Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol a una caja de 60  $\text{mm}^3$ . Se raspan las células y se mantiene a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 día. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregan 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío, se agita fuertemente durante 15 segundos y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo para la extracción de mRNA. Se trabaja con la fase orgánica e interfase para la extracción de proteínas y DNA. A continuación se agregan 300  $\mu\text{L}$  de Etanol al 100% por mL de TRIzol para precipitar el DNA. Se mezcla por inversión y se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo y el pellet se puede recuperar y almacenar ya que es el DNA. Al sobrenadante recuperado se le agregan 1.5 mL de isopropanol por mL de TRIzol y se deja incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se descarta el sobrenadante y el pellet formado se lava con 2 mL de solución de lavado (Hidrocloruro de guanidina 0.3 M en EtOH al 95%) durante 20 minutos. Se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se repiten los lavados con solución de lavado de 2 a 4 veces. Se agregan 2 mL de EtOH al 100% y se incuba durante 20 minutos. Centrifugar a 7500 g por 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Descartar el sobrenadante y repetir el lavado con EtOH al 100% de 2 a 3 veces. Finalmente, se deja secar el pellet (no por completo) y se resuspende en SDS 1% a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Guardar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

### 8.6 qRT-PCR

Se extrajo el RNA total mediante el método de TRIzol® (Life technologies). Brevemente, se le agregan 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol a una caja de 60  $\text{mm}^3$ . Se raspan las células y se congela a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 día. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregan 200  $\mu\text{L}$  por mL de TRIzol de cloroformo frío y se agita fuertemente durante 15 segundos y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo (la fase orgánica e interfase se guardan para la extracción de proteínas y DNA). Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y se mezcla por inversión suave. Se deja incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet formado con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifuga a 10000 g por 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se descarta el sobrenadante. Este último paso se repite de 2 a 3 veces. Se deja secar el pellet, no por completo, al aire libre y se agregan 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Se deja incubar durante 20 a 40 minutos a  $55\text{ }^\circ\text{C}$  para disolver el pellet. Se guardan las muestras a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

La cuantificación de la concentración de mRNA se realizó utilizando el NanoDrop 2000 de ThermoScientific. Una vez realizada la cuantificación se evaluó la integridad del RNA extraído con un gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturizantes con Urea (200 mM

concentración final en la mezcla con la muestra). Una vez comprobada la integridad del RNA extraído se realiza la reacción de retrotranscripción para obtener el cDNA. Esta reacción se llevó a cabo con el Kit de Promega ImProm II Reverse Transcription System.

Una vez obtenido el cDNA, las reacciones para el PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron con 20 ng de cDNA. Se utilizó como control de carga el gen endógeno *Gapdh*. El kit utilizado fue el SYBR fast de Kappy Biosystems en el equipo StepOne de Applied Biosystems y se analizaron los datos utilizando el método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  con el mismo software del StepOne v2.3.

#### 8.6.1 Secuencias de los primers

Gen	Fwd	Rev
<i>Sirt1</i>	AGA GCC ATG AAG TAT GAC AAA GAT	TGG GGT ATA GAA CTT GGA ATT AGT G
<i>Bace-1</i>	AAA TGG ACT GCA AGG AGT ACA ACT A	CTT TCT TGG GCA AAC GAA GGT
<i>Adam10</i>	CTG ATC ATG CTA ATG GCT GGA TTT	TAA AGT GCC TGG AAG TGG TTT AGG
<i>Gapdh</i>	GCC TGG AGA AAC CTG CCA A	CTT TAG TGG GCC CTC GGC

#### 8.7 Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó con la prueba “T de student”. Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$ SEM de una n = 3 cultivos independientes por duplicado para los experimentos de actividad oxido-reductora mitocondrial (MTT) y para la cuantificación de la relación NAD<sup>+</sup>/NADH. Se utilizó un valor de significancia de p<0.05 para el análisis de los resultados obtenidos en Western Blot y qRT-PCR (n = 3), mientras que para los resultados obtenidos de los ensayos de MTT y de la relación NAD<sup>+</sup>/NADH se utilizó un valor de significancia de p<0.01. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 5<sup>®</sup> (La Jolla, CA, EU).

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Actividad oxido-reductora mitocondrial

El ensayo de reducción del tetrazolio MTT a cristales de formazan ayuda a determinar la actividad óxido-reductora mitocondrial en conjunto con la viabilidad celular. Esto se debe a que la actividad óxido-reductora mitocondrial se considera directamente proporcional al número de células viables por lo que una reducción en la formación de cristales de formazan se correlaciona con una baja actividad óxido-reductora mitocondrial y por lo tanto poca viabilidad celular.<sup>58</sup>

Dado que la concentración de glucosa en el Neurobasal es de 25 mM en el día cero se necesita que la concentración de glucosa se reduzca significativamente para favorecer la utilización del AP como fuente alterna de energía. De acuerdo con Julio-Amilpas y colaboradores, a los ocho días de cultivo la concentración de glucosa en el medio de cultivo oscila entre 10 y 13 mmol/L (13 mM).<sup>59</sup> Considerando una tendencia lineal en el consumo de glucosa del medio de cultivo, a los 12 DIV la concentración estará entre los 5 y 7 mmol/L por lo tanto se evaluaron los efectos del AP y EX527 los 12 DIV para favorecer el uso de AP por las neuronas.

Se evaluó la actividad óxido-reductora mitocondrial con diferentes concentraciones de AP. La figura 1 muestra los resultados del ensayo de reducción de MTT a los 12 DIV. No se observan cambios significativos en la reducción del MTT con 150 y 200  $\mu$ M a las 24 horas. Sin embargo, con una concentración de 300  $\mu$ M se observa una disminución de aproximadamente 40% en la absorbancia. Esto refleja una disminución en la viabilidad celular.

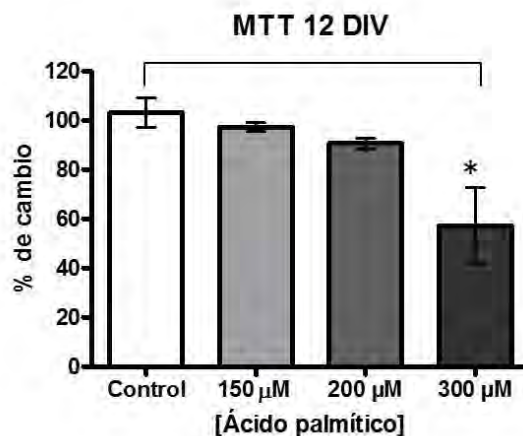


Figura 1 Ensayo de reducción de MTT en cultivos primarios de neuronas de hipocampo a los 12 DIV con tres concentraciones de ácido palmítico. \*  $p < 0.01$  N = 3 y lecturas de cada condición por duplicado.

Dado que con una concentración de 300  $\mu\text{M}$  se observa una disminución de casi el 40% en la viabilidad celular, se decidió trabajar solamente con las otras dos concentraciones para evitar usar una dosis que induce toxicidad celular posiblemente por otros mecanismos.

## 9.2 Relación $\text{NAD}^+/\text{NADH}$

Posteriormente analizamos si el AP afectaba la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  neuronal. Este parámetro no solo es importante por ser indicativo del estado energético celular o del estado redox, además su relación sugiere como podría modificarse la actividad de Sirt1 y es un índice altamente sensible a los cambios en las pozas intracelulares de estos metabolitos.<sup>2</sup> Al ser el  $\text{NAD}^+$  un cofactor de la Sirt1, puede modificar la actividad de esta desacetilasa y afectar el grado de acetilación de diversos factores de transcripción, proteínas citoplasmáticas e histonas.

La figura 2 muestra una disminución de casi el 50% en la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  con ambas concentraciones de AP de manera significativa. Dicho resultado sugiere que el AP está siendo metabolizado por las neuronas hipocampales lo que consume  $\text{NAD}^+$  y aumenta el NADH.

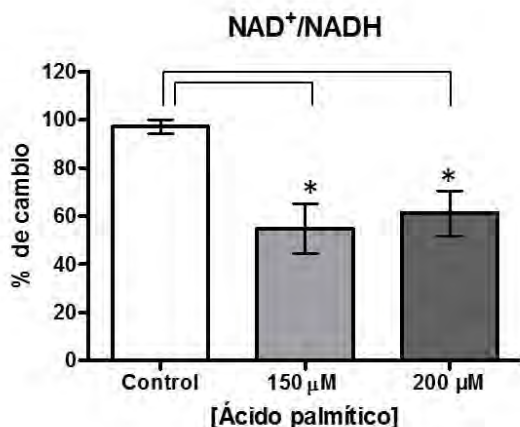


Figura 2 Cuantificación de la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  en cultivo primario de neuronas de hipocampo. Se observa una reducción de la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  de manera significativa con ambas concentraciones de ácido palmítico. \* $p < 0.01$ .  $N = 3$  y lecturas de cada condición realizadas por duplicado.

## 9.3 Efectos del AP en la expresión y función de Sirt1

Una de las proteínas que se ve modulada por el consumo o la restricción de nutrientes es Sirt1.<sup>7</sup> Esta HDAC III tiene como blanco histonas y proteínas citoplasmáticas que incluyen proteínas de vías de señalización, factores de transcripción, proteínas estructurales, entre otras más.<sup>60,61</sup> En un cultivo de una línea celular de monocitos humanos se reporta que la expresión de Sirt1 tanto a nivel de mRNA y de proteína disminuye cuando



se expone a AP no así con otros ácidos grasos.<sup>23</sup> Por lo tanto, fue de interés cuantificar los niveles de mRNA y de proteína de Sirt1 con ambas concentraciones de AP (Figura 3A y 3B).

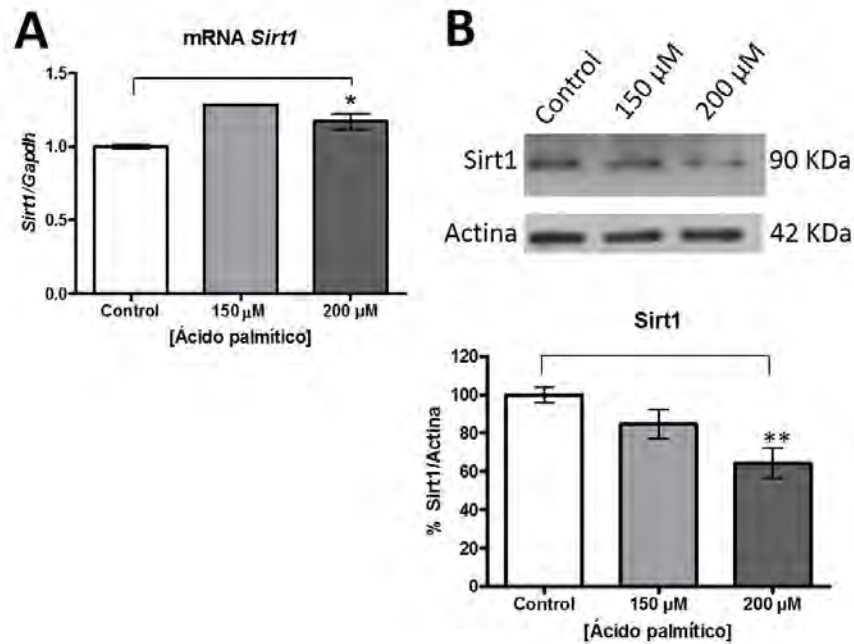


Figura 3 A) Cuantificación del mRNA de Sirt1. Se observa un aumento significativo del mRNA con 200 μM de AP. \* $p < 0.05$  Control N = 3, 150 μM N = 2 y 200 μM N = 3 B) Cuantificación de los niveles proteicos de Sirt1. Existe una disminución significativa con una concentración de 200 μM de AP. \* $p < 0.05$  N = 3.

La cuantificación del mRNA de *Sirt1* muestra un aumento significativo respecto a la condición control con una concentración de 200 μM de AP (Figura 3A). Sin embargo, los niveles de proteína muestran una disminución con la concentración de 200 μM (Figura 3B). En concordancia con otros reportes se observa una disminución en la cantidad de proteína por efecto de AP o de HFD.<sup>18,23</sup> Sin embargo, a pesar de que diferentes grupos de investigación han encontrado una reducción en la cantidad de mRNA de *Sirt1* cuando se expone a HFD o AP,<sup>42</sup> nosotros encontramos una ligera elevación en los niveles mRNA y de manera muy interesante no observamos una correlación de la cantidad de mRNA con la de proteína Sirt1.

A pesar de que se observa una reducción en la cantidad de Sirt1, es importante caracterizar su actividad en ciertos blancos proteicos dado que muchas veces la cantidad de proteína no es directamente proporcional a la actividad. Esto debido a que otras enzimas de la misma familia pueden suplir sus funciones como es el caso de Sirt2 o Sirt6.<sup>62-64</sup> Se ha reportado que la actividad de sus proteínas blanco se afecta por un incremento en la acetilación evitando su activación o inactivación, según sea el caso. Este grado de acetilación se puede utilizar como marcador de actividad de Sirt1. Dado esto se cuantificó la acetilación del factor de transcripción NF-κB p65.

La acetilación de la lisina 310 (K310ac) de la subunidad p65 de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B es importante para su activación como factor de transcripción. Este residuo de lisina es blanco específico de Sirt1, por lo que un aumento o disminución en su cantidad se relaciona directamente con la actividad de Sirt1.<sup>65,66</sup> En la figura 4 se puede observar como el aumento de la acetilación es dependiente de dosis alcanzando niveles significativos con 200  $\mu$ M de AP a las 24 horas del tratamiento.

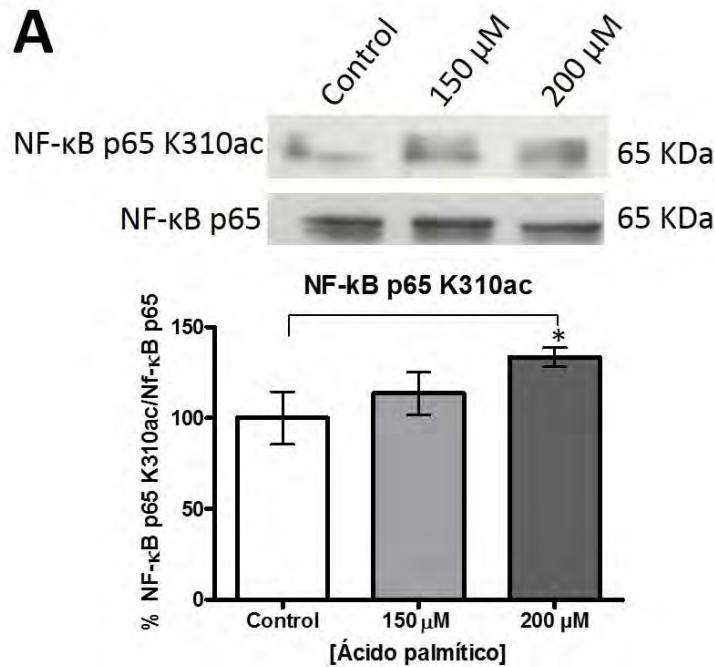


Figura 4 A) Cuantificación de NF- $\kappa$ B p65 K310ac. Se observa que con una concentración de 200  $\mu$ M de AP se aumenta la acetilación de la p65 significativamente. \* $p < 0.05$  N = 3.

#### 9.4 Efecto del AP en proteínas relacionadas con el procesamiento de la APP.

La aparición de marcadores de la EA se ha visto exacerbado por el consumo de HFD.<sup>19,24,43</sup> Antecedentes del laboratorio reportan una disminución en el fragmento sAPP $\alpha$  así como una alteración en diferentes proteínas de la vía amiloidogénica, como Bace-1 y la misma APP, en astrocitos y la línea celular MSN (neuroblastoma diferenciado) al ser tratados con colesterol, otro componente de las HFD.<sup>33,67</sup> Sin embargo, en el laboratorio no se han estudiado los efectos del AP en las proteínas implicadas en el procesamiento de la APP.

Primero se cuantificó la cantidad total de la APP (Figura 5). La cuantificación de la APP no muestra cambios significativos. Sin embargo, se observa una tendencia a disminuir con una concentración de 200  $\mu$ M de AP.

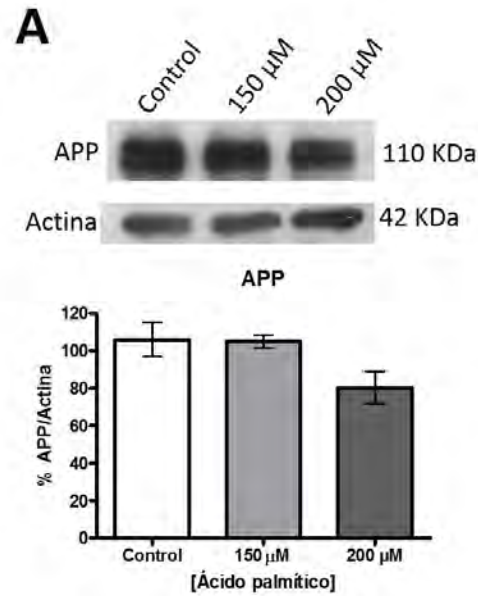


Figura 5 Cuantificación de APP. No se observan cambios significativos en la disminución observada con un tratamiento de 200  $\mu$ M de AP. N = 3.

Estos cambios observados concuerdan con lo reportado por diferentes grupos de investigación donde muestran que no existen cambios en la cantidad total de la APP cuando someten a ratones al consumo e HFD. De manera interesante estos grupos observan un aumento en aquellos fragmentos producidos por el procesamiento a través de la vía amiloidogénica.<sup>24</sup> Por lo tanto, a pesar de que no existan cambios en la cantidad total de la APP, el procesamiento podría verse alterado por un favorecimiento de la vía amiloidogénica.

Dado esto se decidió analizar la cantidad de proteína y de mRNA de las dos enzimas que inician los procesamientos de la APP, Adam10 y Bace-1. Esto con el fin de determinar si existe alguna modificación que pueda favorecer el inicio del procesamiento amiloidogénico o que inhiba el procesamiento no amiloidogénico.

Adam10 es una metaloproteasa dependiente de  $Zn^{2+}$  ubicada en la membrana celular principalmente en sinapsis neuronales. Esta enzima es la encargada de realizar un corte a la APP para iniciar la vía no amiloidogénica. La figura 6A muestra la cuantificación del mRNA y la figura 6B muestra la cuantificación de los niveles de proteína de Adam10 con los tratamientos de AP en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

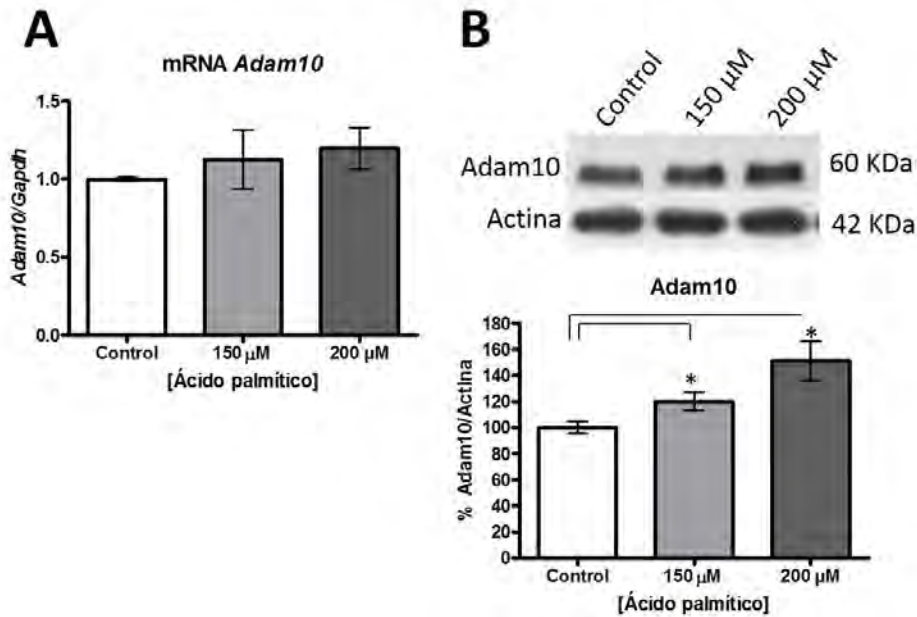


Figura 6 A) Cuantificación del mRNA de Adam10. Se observa una tendencia al aumento en la transcripción del gen B) de manera significativa con una dosis de 200 μM de AP. \* $p < 0.05$  N = 3.

La cuantificación del transcrito del gen *Adam10* no muestra cambios significativos solo una ligera tendencia a aumentar (Figura 6A), mientras que la proteína muestra un aumento significativo con ambas concentraciones de AP respecto al control (Figura 6B) que parece ser dosis dependiente.

Se sabe que la vida media de Adam10 es de más de 24 horas por lo que el tiempo de incubación utilizado para este proyecto podría no ser suficiente para observar una disminución en la cantidad de proteína madura<sup>68</sup> en caso de que el AP tuviera un efecto en su degradación proteica o la regulación de su transcripción. Sin embargo, es necesario cuantificar los niveles de los fragmentos solubles y C-terminales para poder concluir si el aumento en la cantidad de proteína correlaciona con un aumento en la actividad.

Por otro lado, Bace-1 es una enzima ubicada en las balsas lipídicas en la membrana mayoritariamente de las terminales sinápticas que lleva a cabo el procesamiento amiloidogénico de la APP. Sin embargo se encuentra internalizada en vesículas y es aquí donde lleva a cabo su actividad de proteasa ya que necesita un pH ácido para tener una actividad óptima.<sup>69</sup> Dada su importancia en la aparición de las placas amiloides se cuantificó su nivel de mRNA y proteína.

El contenido del mRNA de *Bace-1* (Figura 7A) no muestra cambios significativos pero si una ligera tendencia a disminuir con ambas dosis de AP. La proteína Bace1 muestra un aumento significativo con una dosis de 200 μM de AP (Figura 7B).

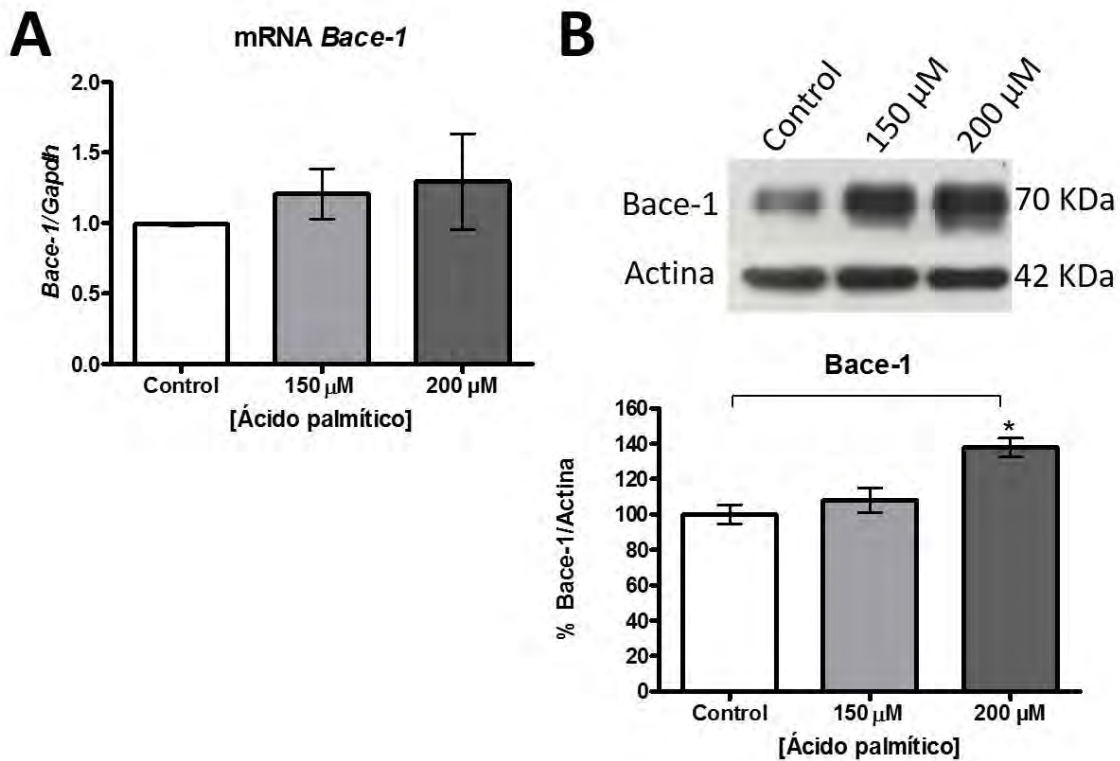


Figura 7 A) Cuantificación del mRNA de *Bace-1*. No se observan cambios significativos en los niveles del transcrito, solo una ligera tendencia a disminuir. B) Cuantificación de *Bace-1* mediante Western Blot. Se observa un aumento significativo en la cantidad de proteína con una dosis de 200 μM de AP. \* $p < 0.05$  N = 3.

El aumento en la proteína de *Bace-1* correlaciona con lo reportado por otros grupos de estudio en diferentes modelos y por exposición a diferentes compuestos de las HFD.<sup>24,33,43,45,46,50,67</sup> Sin embargo, ya que no observamos una correlación de los niveles del mRNA con los niveles de proteína se deben considerar los mecanismos de regulación post-transcripcional que esta proteína tiene.

### 9.5 Efecto del inhibidor EX527 en la expresión y función de sirt1

Uno de los mecanismos que proponemos para explicar las alteraciones en el procesamiento de la APP debido a la presencia de dietas con alto contenido de AP es a través de la Sirt1. Esto debido a las asociaciones que vinculan a las HFD y la restricción calórica con la aparición de marcadores de neurodegeneración a través de la inhibición o activación de Sirt1, respectivamente.<sup>7,42,70,71</sup> La aproximación experimental con la que se decidió evaluar la participación de Sirt1 en las modificaciones en las proteínas involucradas en el procesamiento de la APP observadas con AP fue inhibiendo su actividad enzimática con el EX527.

Este inhibidor muestra una gran especificidad hacia Sirt1 con concentraciones de hasta 100 μM. Sin embargo, la dosis utilizada es aquella reportada por Min y colaboradores

(50  $\mu\text{M}$ ) donde ellos observan que se compromete la transcripción de algunos genes.<sup>72</sup> Es de interés utilizar una dosis que comprometa la transcripción de genes ya dentro de los blancos de Sirt1 están las histonas y factores de transcripción,<sup>73,74</sup> vinculando así el sensor energético con la transcripción de genes implicados en la aparición de marcadores de la EA.<sup>50,55</sup>

Primero se decidió cuantificar la acetilación de NF- $\kappa$ B p65 en dos ventanas de tiempo (12 y 24 horas) para observar si existía un tiempo óptimo de inhibición del EX527 en un periodo de 24 horas (Figura 8).

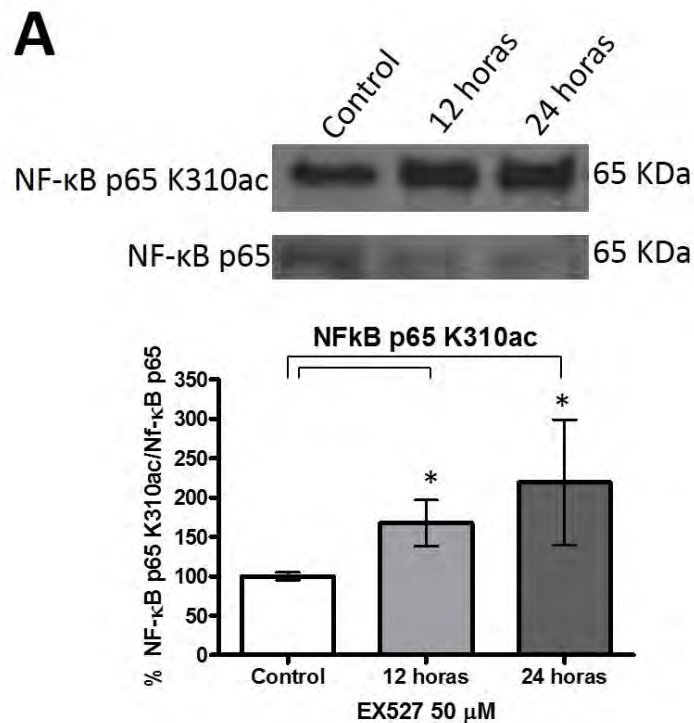


Figura 8 Cuantificación de NF- $\kappa$ B p65 K310ac. Se observa un aumento significativo de la acetilación desde las 12 horas con el EX527. \* $p < 0.05$  N = 3.

Este resultado muestra como la inhibición de la actividad de Sirt1 es efectiva desde las 12 horas y se mantiene hasta las 24 horas. La diferencia entre las 12 y 24 horas no es significativa por lo que esta dosis, desde las 12 horas, puede ser suficiente para generar cambios a nivel transcripcional de los genes de interés implicados en el procesamiento de la APP.

A pesar de haber comprobado la inhibición de Sirt1 por el EX527 se sabe que esta inhibición de Sirt1 puede tener efectos en su mismo mRNA. Este mecanismo de retroalimentación negativa involucra una vía en la que participan el miR34a y p53.<sup>71,75</sup> Dado esto se cuantificaron los niveles de mRNA de *Sirt1* y los niveles de proteína (Figura 9).

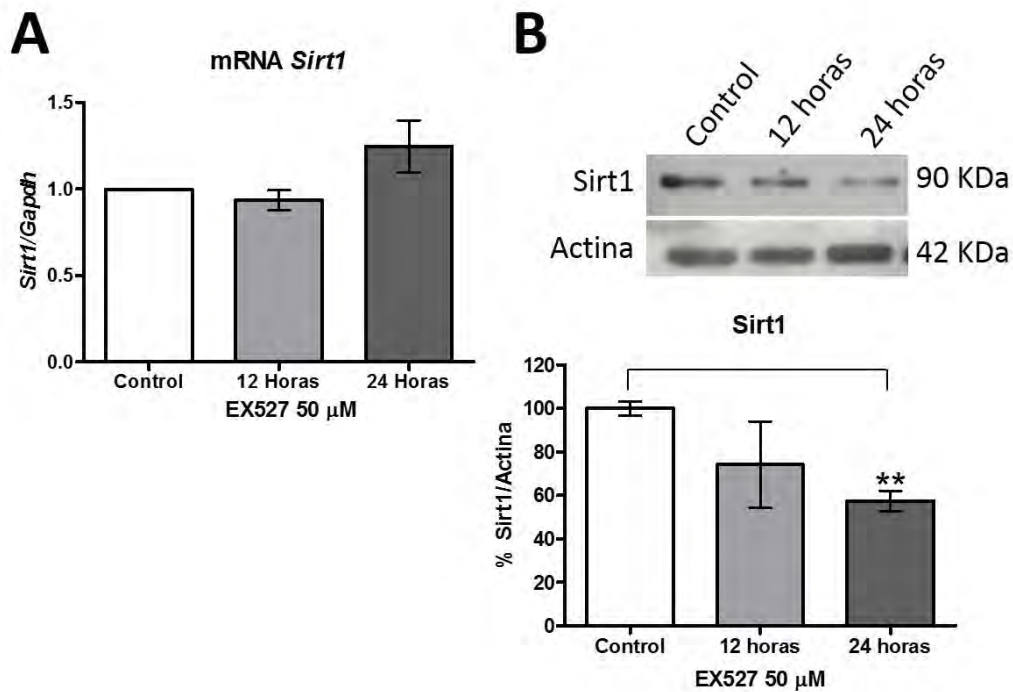


Figura 9 A) Cuantificación del mRNA de Sirt1. No se observan cambios significativos solo una tendencia a aumentar a las 24 horas del tratamiento. B) Cuantificación de los niveles proteicos de Sirt1. Se observa una disminución que es significativa a las 24 horas del tratamiento. \* $p < 0.05$  N = 3.

La cuantificación de Sirt1 (Figura 9A) muestra que no existen cambios significativos en los niveles del mRNA, solo una tendencia a aumentar a las 24 horas del tratamiento. Sin embargo, en los niveles proteicos (Figura 9B) se observa una disminución significativa a las 24 horas del tratamiento con el EX527.

### 9.6 Efecto del EX527 en proteínas relacionadas con el procesamiento de la APP.

Dado que se busca correlacionar las alteraciones en la expresión y función de la Sirt1, bien sea directamente o a través de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B p65, con las modificaciones observadas en las enzimas iniciales en el procesamiento de la APP se cuantificaron los niveles proteicos y de mRNA de Bace-1 y Adam10 y la cantidad de proteína total de la APP.

Respecto a la APP no se observan cambios significativos en la cantidad total (Figura 10) con la dosis administrada a los dos tiempos evaluados. Sin embargo, se observa una tendencia a incrementar a las 12 horas.

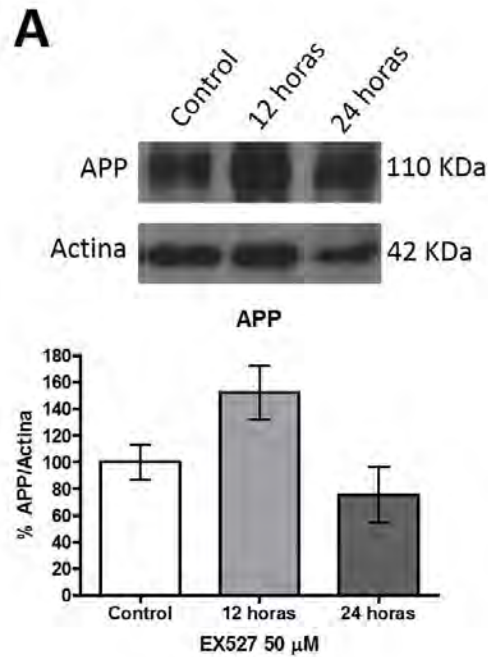


Figura 10 Cuantificación de la APP. No se observan cambios significativos con la dosis utilizada a los dos tiempos evaluados.  $N = 3$ .

Por otro lado, analizamos los niveles de mRNA de *Adam10* (Figura 11A) y los niveles proteicos de Adam10 (Figura 11B) posterior a la inhibición de la Sirt1 con el EX527. Encontramos un ligero pero significativo incremento en la expresión de Adam10 y una tendencia a disminuir el contenido proteico a los tiempos y dosis analizados.

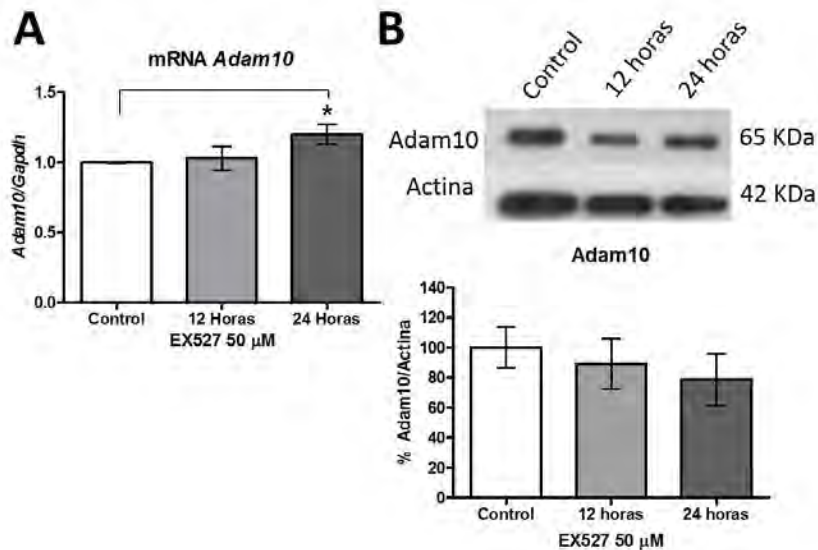


Figura 11 A) Cuantificación del mRNA de Adam10. Se observa un aumento significativo de la transcripción a las 24 horas del tratamiento con  $50 \mu\text{M}$  de EX527. B) Cuantificación de la cantidad de proteína de Adam10. Se observa una tendencia a disminuir sin ser estadísticamente significativa.  $*p < 0.05$   $N = 3$ .



A continuación se cuantificó el mRNA de *Bace-1* (Figura 12A) así como la cantidad de proteína (Figura 12B). Aunque de manera preliminar, dada la variación de los resultados obtenidos, no se observan cambios significativos en la cuantificación del mRNA se observa una tendencia a aumentar a lo largo de 24 horas. En cuanto a la cantidad de proteína, no se generan cambios significativos pero si observamos una tendencia en la cual la proteína aumenta a las 12 horas y a las 24 horas disminuye.

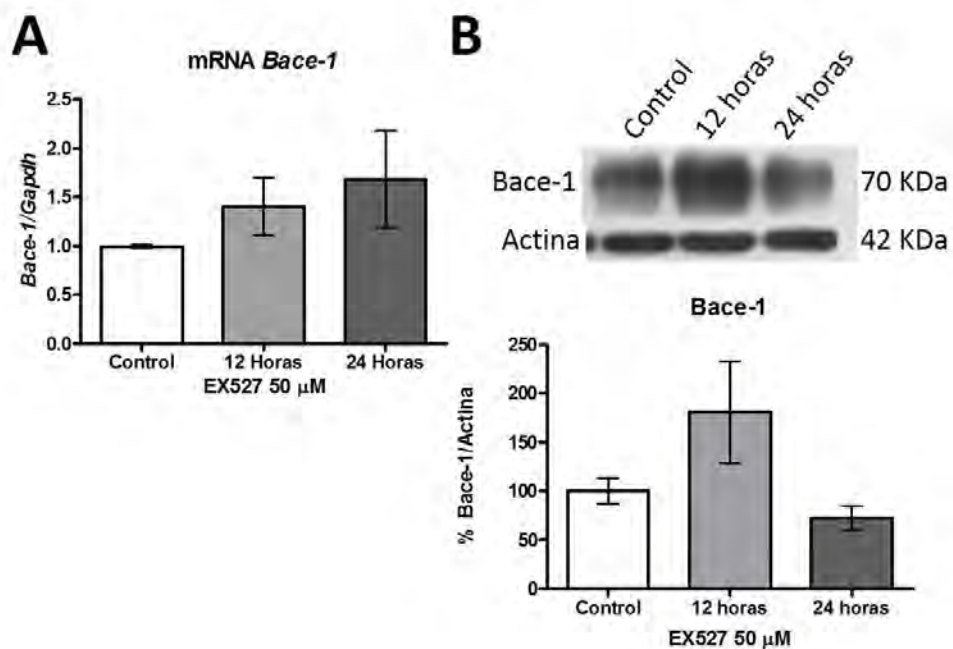


Figura 12 A) Cuantificación del mRNA de *Bace-1*. No se observan cambios significativos. B) Cuantificación de la cantidad de proteína de *Bace-1*. No se observan cambios significativos. N = 3.

## **10. DISCUSIÓN**

Los resultados presentados en este trabajo abren la posibilidad a que diferentes mecanismos en la regulación de algunas de las proteínas involucradas en el procesamiento de la APP jueguen un papel importante posiblemente involucrando a proteínas que se han señalado importantes en diferentes condiciones metabólicas, envejecimiento y en la aparición de marcadores de neurodegeneración como la Sirt1.

La disminución en la expresión y función de Sirt1 se ha caracterizado en diferentes enfermedades como diabetes, resistencia a la insulina, obesidad, cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Además tanto la expresión como la función se han visto disminuidas en envejecimiento e implicadas en la regulación de proteínas relacionadas con la aparición de marcadores de la EA. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos de regulación que puedan estar vinculando todas estas condiciones con el favorecimiento la vía amiloidogénica por la inhibición de Sirt1 inducida por AP.

Además de poder determinar la toxicidad de un compuesto mediante la reducción del MTT, otro parámetro que puede ser evaluado con este experimento es la actividad metabólica. Esto se debe a que el compuesto es reducido por el complejo II de la mitocondria, la Succinato Deshidrogenasa, y por el NADH que se encuentra fuera de la membrana interna mitocondrial.<sup>58</sup> Observamos que no hay cambios significativos hasta con una concentración de 200  $\mu$ M después de 24 horas de tratamiento, aunque experimentos del laboratorio muestran que en presencia del AP existe un ligero incremento en la reducción del MTT después de 1 hora de tratamiento con AP (Calvo-Ochoa y colaboradores, en preparación). Esto sugiere que el incremento en la actividad metabólica es inmediato a la administración del AP sin embargo otros parámetros metabólicos podrían estarse afectando. Por lo tanto, se decidió cuantificar la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  para caracterizar si existía una modificación en el metabolismo energético.

El tratamiento con AP de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo produjo una reducción en la cantidad de  $\text{NAD}^+$  sugiriendo un papel metabólico importante en las neuronas. A pesar de observar una reducción en la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , no podemos estar seguros del mecanismo por el cual se ven afectadas las pozas intracelulares. El AP puede generar las alteraciones metabólicas a través de diferentes mecanismos entre los que se encuentran:

- Un aumento en la producción de ceramidas y diacilglicerol afectando la vía de señalización de la insulina.<sup>76,77</sup>
- Puede aumentar el metabolismo energético mediante su  $\beta$ -oxidación generando una mayor cantidad de NADH y ATP.<sup>2,78,79</sup>

- Utilizándose como sustrato para palmitoilar una gran cantidad de proteínas, entre ellas a Bace-1, afectando su actividad enzimática, localización celular o vida media.<sup>69,80,81</sup>
- Mediante la unión al TLR4 (Toll-Like Receptor 4) puede inducir inflamación activando a la familia de factores de transcripción NF-κB.<sup>82-84</sup>

Sin embargo, la mayor parte de los mecanismos antes mencionados se han descrito en otros modelos como músculo esquelético, tejido adiposo, hígado, macrófagos, trofoblastos, entre otros. Poco se sabe sobre estos mecanismos y el sistema nervioso central, en especial sobre su acción directa en neuronas. Esto se debe a que algunos grupos han reportado una baja tasa de  $\beta$ -oxidación en neuronas e incluso se pone en duda que los ácidos grasos saturados puedan atravesar la barrera hematoencefálica.<sup>20,85,86</sup>

No obstante, el hecho de caracterizar una disminución en el NAD<sup>+</sup> neuronal en conjunto con otros resultados del laboratorio sobre los efectos negativos del AP en la vía de señalización de la insulina (Calvo-Ochoa y colaboradores, en preparación) abre la posibilidad de que cualquiera de estos mecanismos esté afectando a la neurona propiciando la aparición de marcadores de neurodegeneración. Además se sabe que la relación NAD<sup>+</sup>/NADH se encuentra alterado en envejecimiento, lo cual relaciona una vez más el consumo de dietas altas en grasa con envejecimiento patológico y alteraciones en el metabolismo energético.

La reducción del NAD<sup>+</sup> y la disminución en la proteína Sirt1 correlacionan con el aumento en la acetilación de NF-κB p65, sugiriendo que en presencia del AP se produce una disminución en la actividad de desacetilasa de la Sirt1. Por otro lado, la discrepancia entre la elevación de mRNA y la disminución en la cantidad de la proteína de Sirt1 que encontramos podría relacionarse con los mecanismos de regulación entre la transcripción y la traducción. Varios grupos han reportado al miR34a como un regulador post-transcripcional importante del mRNA de *Sirt1*.<sup>71</sup> Este mismo miRNA se ha visto desregulado en diferentes condiciones como inflamación, envejecimiento y alteraciones metabólicas.<sup>73,87</sup>

Por otro lado, se ha reportado que ante señales de estrés metabólico la Sirt1 puede degradarse mediante cortes proteolíticos por caspasas o por una desregulación de las cinasas JNK-1 que la pueden fosforilar y enviar a degradación vía proteosoma.<sup>88-90</sup> La función de las JNKs se reporta alterada en diferentes tejidos, incluido el cerebro, en condiciones metabólicas como resistencia a la insulina, inflamación, obesidad y neurodegeneración.<sup>90,91</sup> Esto sugiere un posible mecanismo por el cual la cantidad de Sirt1 sea menor cuando se tratan las neuronas hipocampales con AP. Por lo tanto, la reducción en la cantidad proteica puede deberse a una desregulación en el proceso post-

transcripcional mediado por el miR34a o por degradación mediado por cinasas como JNK1 o las caspasas.

Uno de los efectos que claramente observamos por la exposición a AP es el aumento en la acetilación de NF- $\kappa$ B p65. Como ya se mencionó, el aumento en la acetilación de p65 puede deberse a la disminución observada tanto de la expresión de Sirt1 como de la actividad inhibida por la reducción del NAD<sup>+</sup> en la neurona. La acetilación de p65 genera una activación de este factor de transcripción promoviendo su translocación a núcleo y su unión a las secuencias consenso en diferentes promotores en los que se ha reportado su presencia.<sup>66,92</sup>

Este factor de transcripción generalmente se asocia a la activación de genes pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-6. Dicho factor es de suma importancia ya que procesos inflamatorios son característicos de enfermedades metabólicas, envejecimiento siendo este un evento que precede a la EA.<sup>66,92</sup> Por otro lado, se ha reportado que p65 juega un papel importante en la activación de la transcripción de otros genes como *Bace-1*<sup>51,52,57</sup> vinculando el aumento en la activación de p65 por exposición a AP con modificaciones en el metabolismo de la APP. Sin embargo, no es el único mecanismo por el cual este factor de transcripción podría estarse activando dado que el AP puede tener múltiples mecanismos de acción.

Se sabe que el AP puede unirse al TLR4 activando la vía de señalización que permite la acetilación de p65 por CBP/p300, su translocación al núcleo y promoviendo la transcripción de genes pro-inflamatorios.<sup>82</sup> Este sería un mecanismo en el que una vía de señalización pro-inflamatoria pudiera estar jugando un papel importante en caso de que las neuronas no puedan incorporar el AP y metabolizarlo. Por lo tanto, entender los mecanismos sinérgicos o individuales que activan a p65 en neuronas hipocampales cuando se exponen a AP es fundamental para poder comprender mucho mejor la aparición de marcadores de neurodegeneración.

Para comenzar la caracterización sobre el metabolismo de la APP ante la exposición a AP se cuantificó la cantidad total de la APP. Este tratamiento de las neuronas hipocampales no produjo cambios en el contenido total de la APP en concordancia con reportes de otros grupos. Maesako y colaboradores reportan que no existen cambios en la cantidad total de la APP pero sí en aquellos fragmentos producidos por el procesamiento amiloidogénico de la APP al someter a ratones al consumo de HFD.<sup>24</sup> Otro grupo también reporta un aumento en el fragmento CTF del metabolismo amiloidogénico de la APP con exposiciones a HFD sin alteraciones en los niveles totales de la APP.<sup>93</sup> Además experimentos en cultivos primarios de neuronas corticales expuestas a medios condicionados provenientes de cultivos de astrocitos tratados con AP generan un aumento en el

fragmento C99 pero no modifica la cantidad total de la APP.<sup>45</sup> Con estos antecedentes, así como el de Muñoz-Ávila y colaboradores, se puede sugerir que a pesar de que no existen cambios en la cantidad total de APP, el procesamiento pudiera estarse modificando favoreciendo la vía amiloidogénica y reduciendo los fragmentos neurotróficos.

Respecto a la enzima de la vía no amiloidogénica, Adam10, se observó un aumento en la cantidad de proteína y una tendencia al aumento en el mRNA. La regulación de Adam10 se ha reportado a diferentes niveles:

- En su promotor por activación de diferentes factores de transcripción como atRA y el RAR $\beta$ .<sup>94,95</sup>
- Post-transcripcional por miRNAs.<sup>96,97</sup>
- Modificaciones post-traduccionales como maduración de la proteína por corte enzimático para eliminar su prodominio y glicosilaciones.<sup>98-100</sup>
- Ubicación en la membrana celular donde se ha caracterizado fuera de balsas lipídicas.<sup>97,101</sup>

Dado esto y los datos obtenidos con los tratamientos con AP, se sugiere que el aumento en la cantidad de proteína madura podría atribuirse a un aumento en el corte proteolítico de su prodominio para poder mitigar los efectos deletéreos que se han reportado sobre la vía con el consumo de HFD. Este aumento en el corte generaría una mayor cantidad de proteína madura disponible para realizar el corte inicial de la vía no amiloidogénica.

Por otro lado, se sabe que la enzima amiloidogénica, Bace-1, puede regularse a nivel de promotor por diferentes factores de transcripción (entre ellos NF- $\kappa$ B p65, PPAR $\gamma$ , YY1),<sup>57,102</sup> por su grado de palmitoilación permitiendo una mejor asociación a balsas lipídicas<sup>103</sup> o evitando su degradación y aumentando su vida media<sup>104</sup> y, recientemente, por un RNA largo no codificante (lncRNA) nombrado *Bace1-AS*.<sup>105</sup>

A pesar de que se observa un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B p65 (Figura 4) no se observa un aumento en la expresión del mRNA de *Bace-1*. Esto podría deberse a que la cromatina del promotor no se encuentra lo suficientemente abierta para permitir la unión de factores de transcripción que activen su transcripción. Sin embargo, de manera interesante la exposición al AP si indujo un incremento en la proteína de Bace-1. Aunque no tenemos evidencia que explique esta falta de correlación, recientemente, Faghini y colaboradores describieron al lncRNA *Bace1-AS* encargado de regular la estabilidad del mRNA de *Bace-1*. Este mecanismo se da mediante la formación de una cadena dúplex de RNA *Bace-1* con *Bace1-AS* generando una mayor estabilidad y vida media del mRNA.<sup>105</sup> Este efecto propicia una mayor traducción de proteína y por lo tanto en una mayor

disponibilidad para procesar a la APP por la vía amiloidogénica. Además dicho lncRNA se encuentra elevado en el cerebro de pacientes con la EA.<sup>105</sup> Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre este mecanismo en pacientes con síndromes metabólicos o sobre su regulación en condiciones pro-inflamatorias, envejecimiento o alteraciones metabólicas.

Dichos mecanismos descritos abren la posibilidad de que los hallazgos en el presente trabajo sobre el aumento en la proteína Bace-1 más no en su mRNA se deban a una regulación post-transcripcional del mRNA y no a una regulación transcripcional directamente en la cromatina.

Aunque no fue estudiado en el presente proyecto, otro aspecto importante sobre efecto del AP en el incremento de la enzima amiloidogénica Bace-1 y su actividad enzimática es el grado de palmitoilación de la enzima. Esta modificación post-traducciona es importante para su reclutamiento a balsas lipídicas y vida media. Esta ubicación fomenta su interacción con la APP para que al ser internalizadas se pueda generar el corte y producir los fragmentos C99 y sAPP $\beta$ . Por lo que, la palmitoilación de esta enzima es una regulación clave de su actividad enzimática y ubicación. Esta modificación post-traducciona estará directamente afectada por la cantidad de AP disponible para la neurona. Esto nos sugiere que un aumento en la disponibilidad de AP podría generar una mayor palmitoilación de Bace-1 generando un mayor tiempo de asociación a balsas lipídicas, favoreciendo la interacción con la APP y procesándola por la vía amiloidogénica.

Por lo tanto, los efectos generados por AP en algunas de las proteínas involucradas en el procesamiento de la APP parecen ser a nivel post-transcripcional y post-traducciona. Esto debido a que el aumento en las cantidades proteicas es evidente mientras que no se observan cambios a nivel del transcrito de los mRNAs. Sin embargo, aún debe evaluarse tanto los mecanismos discutidos en el texto como la ubicación y actividad enzimática para la producción de los diferentes fragmentos implicados en sobrevivencia neuronal o neurodegeneración.

El mecanismo que proponemos para explicar las alteraciones en el procesamiento de la APP debido a la presencia de dietas con alto contenido de AP es a través de la inhibición de Sirt1. Sin embargo, los efectos observados con AP no fueron los mismos que al inhibir directamente a la Sirt1 con el EX527. Esto pudiera deberse a que el AP no solo modifica la actividad y expresión de Sirt1 sino también se ha visto involucrado en otros procesos y mecanismos celulares que podrían actuar en sinergia o contrarrestarse unos a otros.

Por un lado se encontró una disminución en los niveles de la proteína Sirt1 que podría deberse a una degradación dado que no existen cambios significativos en los niveles

del mRNA. Sin embargo, Katto y colaboradores demostraron que el mismo NF- $\kappa$ B p65 acetilado puede regular de forma positiva la transcripción de *Sirt1*.<sup>106</sup> Por lo que al encontrarse acetilado podría estar activando la transcripción de *Sirt1* como se observa en la figura 9A. Esto con el propósito de compensar por la falta de actividad y de cantidad de proteína observada en los experimentos realizados. A pesar de que NF- $\kappa$ B pudiera estar activando la transcripción del gen, se debe tomar en cuenta el sistema de regulación p53/miR34a que pudiera estar evitando la traducción del mRNA.

A pesar de que el EX527, por estar inhibiendo la actividad de desacetilasa de la Sirt1, permite la transcripción de ciertos genes, no indujo la transcripción de su propio gen. En este sentido existen datos interesantes sobre el mecanismo de regulación post-transcripcional negativo que ejerce el miR34a sobre *Sirt1*.<sup>107</sup> Al facilitarse la transcripción de genes se puede promover el aumento en la cantidad de miR34a generando una degradación del mensajero de *Sirt1*. Además se sabe que un aumento en la acetilación de p53 induce la expresión del miR34a<sup>107</sup> y al estar inhibida la actividad de desacetilasa de Sirt1, los niveles de p53 acetilados estarían elevados contribuyendo al aumento en la transcripción del miR34a.

Respecto a las enzimas encargadas de iniciar la vía no amiloidogénica (Adam10) y la vía amiloidogénica (Bace-1) se observaron efectos interesantes en los diferentes tiempos evaluados al inhibir a la Sirt1 con EX527.

Encontramos un incremento del mRNA de *Adam10* pero no de la proteína en presencia del inhibidor, lo que sugiere un papel regulatorio importante por parte de Sirt1 a nivel transcripcional de *Adam10*. A pesar de que dos grupos de investigación reportan que Sirt1 puede activar la transcripción de *Adam10* mediante la activación del Receptor de Ácido Retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ),<sup>55,108</sup> hay que tener presente que existen otros mecanismos de regulación que pueden estar siendo activados o reprimidos por la inhibición de Sirt1.

Uno de estos mecanismos depende de la regulación a través de RNAs no codificantes (ncRNA) como el miR-144 y el miR-451 que podrían estar aumentando su transcripción al inhibir a Sirt1. Estos miRNAs regulan negativamente la traducción de *Adam10* por su unión a la región 5' UTR del mRNA.<sup>109</sup> Por lo que al permitir la transcripción de muchos genes por hiperacetilación de histonas se puede favorecer la transcripción de estos miRNAs evitando la traducción del mRNA de *Adam10*.

Por otro lado, se ha reportado que además del RARX existe otro factor de transcripción que regula de manera positiva la transcripción de *Adam10*. Este factor de transcripción es el Receptor Activado de la Proliferación de los Peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , por sus siglas en inglés). Dado que la transcripción del gen del *Adam10* no depende de un solo

factor de transcripción, la inhibición de Sirt1 puede no ser suficiente para reprimir su transcripción. Además PPAR está involucrado en la regulación del metabolismo de ácidos grasos,<sup>110</sup> por lo que puede tener un mayor efecto sobre la transcripción de otros genes cuando las neuronas se exponen a una alta concentración de ácidos grasos como el AP.

En cuanto a Bace-1, se observan ciertas tendencias a aumentar tanto en proteína como en mRNA. Se sabe que ante la inhibición de Sirt1 los niveles de Bace-1 aumentan tanto a nivel de proteína como de mensajero, como ha sido reportado por Marwarha y colaboradores.<sup>50</sup> Nosotros observamos aumento de la proteína y mensajero como una tendencia a las 12 horas, aunque a las 24 h se redujo. Esta discrepancia puede deberse al tipo de modelo e inhibidor que Marwarha y colaboradores utilizan. En su caso es un neuroblastoma y el inhibidor Sirtinol con una dosis muy elevada (400  $\mu$ M). El Sirtinol es una molécula que muestra menor especificidad hacia Sirt1 ya que también se ha visto que puede inhibir a Sirt2 con dosis de hasta 100  $\mu$ M, según lo reportado por Sigma-Aldrich en su hoja técnica. Por lo que los cambios tan pronunciados que este grupo de estudio observan pueden deberse a una inhibición en conjunto de Sirt1 y Sirt2.

La disminución observada en la cantidad de proteína de Bace-1 a las 24 horas podría deberse a una degradación de la proteína ya que la vida media de Bace-1 es de 15 a 17 horas.<sup>105</sup> Dado que no observamos cambios en el mRNA y tomando en cuenta los mecanismos de regulación post-transcripcional, no podemos estar seguros de que se está sintetizando más proteína para reemplazar a aquella que se ha degradado.

Por otro lado, Wang y colaboradores describieron por primera vez un mecanismo de regulación transcripcional diferente a los ya reportados para *Bace-1* en el que participa el complejo Sirt1-PPAR $\gamma$ -PGC1.<sup>70</sup> El complejo descrito genera una represión de la transcripción del gen de *Bace-1*, por lo que una inhibición de Sirt1 podría estar activando la transcripción del gen. Además dado que observamos niveles elevados de NF- $\kappa$ B p65 activo (acetilado), la transcripción del gen podría facilitarse por un reclutamiento diferencial de factores y complejos transcripcionales.

Como antes mencionado, el lncRNA *Bace1-AS* juega un papel sumamente importante en la estabilidad del mRNA de *Bace-1*. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de la regulación de este lncRNA en condiciones metabólicas específicas o con los diferentes complejos que reprimen o activan la transcripción. Dado esto es de gran interés estudiar la regulación post-transcripcional de *Bace-1* por este lncRNA cuando se inhiben proteínas importantes para el metabolismo celular como Sirt1.



## **11. CONCLUSIONES**

Aunque los datos presentados muestran diferencias entre los efectos del AP y de la inhibición específica de la Sirt1 en las enzimas del procesamiento de la APP, debe tomarse en cuenta que los efectos que el AP induce pueden ser múltiples (Figura 13) siendo estos sinérgicos o antagónicos entre ellos. El AP no solo actúa a través del metabolismo energético, la depleción del NAD<sup>+</sup> y la inhibición de Sirt1 (Figura 14), sino de otros mecanismos como la producción de ceramidas y diacilglicerol, modificaciones en la vía de señalización de la insulina, activación de receptores pro-inflamatorios, entre otros.

El AP genera muchos cambios a nivel celular que modifican varios procesos entre ellos la actividad de la Sirt1 mediante el metabolismo energético. Este trabajo es un primer acercamiento sobre cambios en proteínas involucradas en el metabolismo del APP por la exposición al AP y el papel que juega la Sirt1 en este proceso. A pesar de que existen muchos mecanismos de regulación y factores que influyen en el favorecimiento de la vía no amiloidogénica o la vía amiloidogénica los mecanismos discutidos anteriormente podrían estar jugando un papel en conjunto muy importante para potenciar los efectos que se observan en modelos *in vivo* cuando son sometidos a HFD.

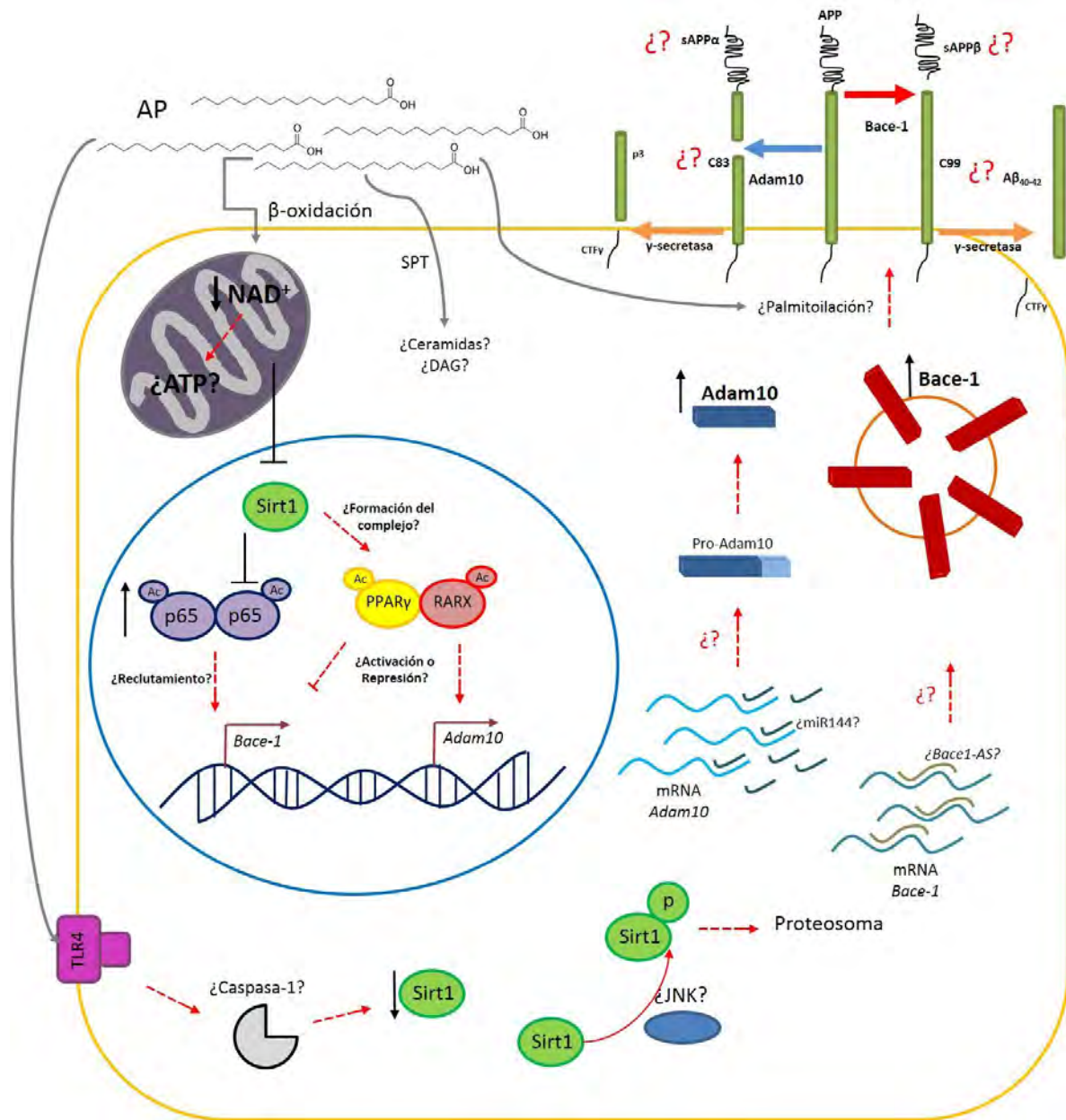


Figura 13 Esquema de los mecanismos propuestos para los efectos observados con AP.

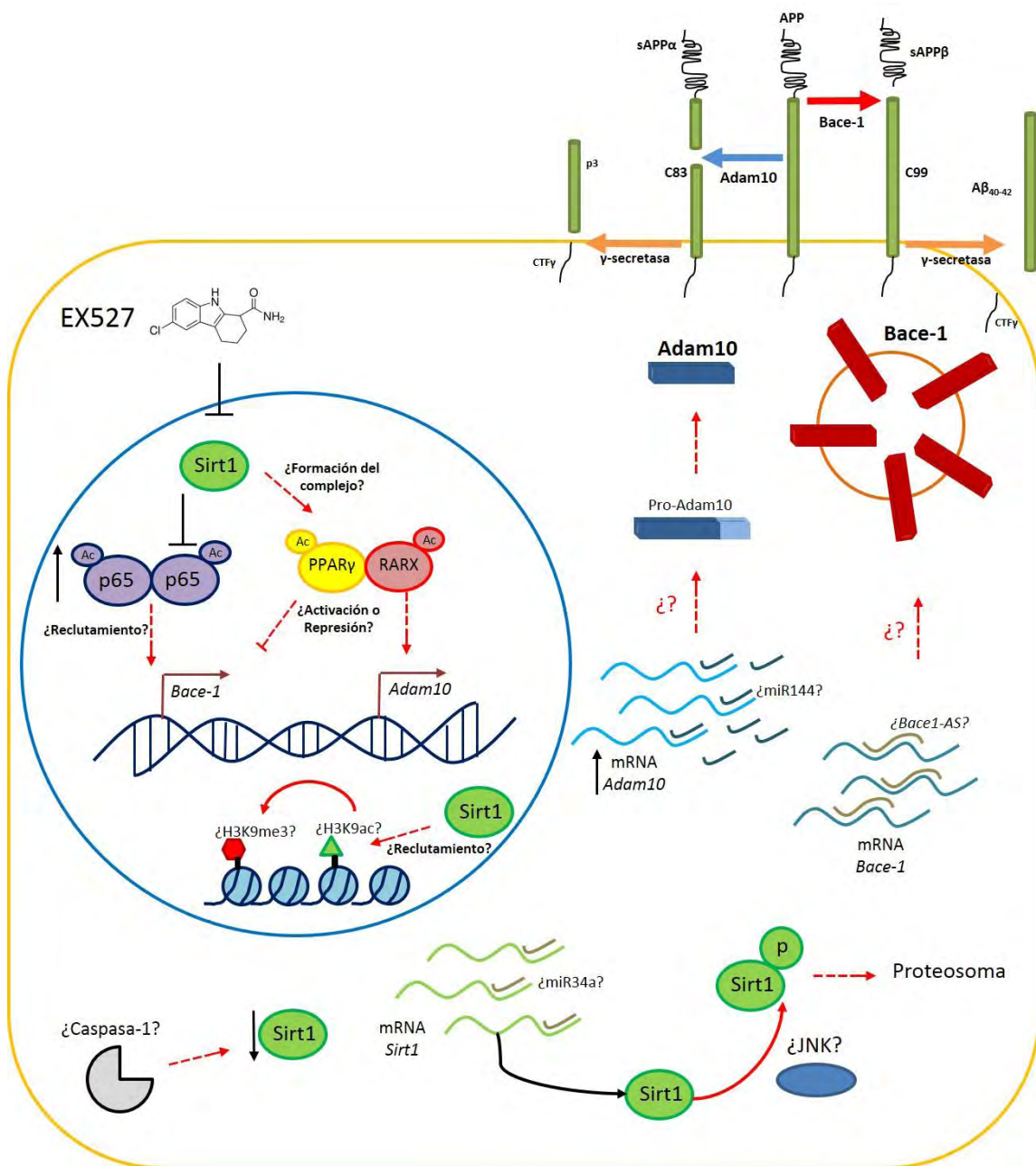


Figura 14 Esquema de los mecanismos propuestos para los efectos observados con el inhibidor específico de Sirt1 EX527.

## **12. REFERENCIAS**

1. Tramutola, A. *et al.* Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): Analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. *J. Neurochem.* **133**, 739–749 (2015).
2. Poljsak, B. & Milisav, I. The NAD(+)-depletion theory of ageing: NAD(+) as the link between oxidative stress, inflammation, caloric restriction, exercise, DNA repair, longevity and health span. *Rejuvenation Res.* rej.2015.1767 (2016). doi:10.1089/rej.2015.1767
3. Verdin, E. NAD+ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science (80-. ).* **350**, 1208–1213 (2015).
4. Min, S.-W., Sohn, P. D., Cho, S.-H., Swanson, R. A. & Gan, L. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 1–9 (2013).
5. Rajendran, R., Garva, R., Krstic-demonacos, M. & Demonacos, C. Sirtuins : Molecular Traffic Lights in the Crossroad of Oxidative Stress , Chromatin Remodeling , and Transcription. **2011**, (2011).
6. Wątroba, M. & Szukiewicz, D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv. Med. Sci.* **61**, 52–62 (2015).
7. Guarente, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. 2072–2085 (2013). doi:10.1101/gad.227439.113.Freely
8. Cohen, H. Y. Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. *Science (80-. ).* **305**, 390–392 (2004).
9. Lee, S. & Min, K. Caloric restriction and its mimetics. **6696**, (2013).
10. Chen, D. & Guarente, L. SIR2 : a potential target for calorie restriction mimetics. **13**, (2006).
11. Kahn, M. *et al.* Neurobiology of Disease A Dietary Regimen of Caloric Restriction or Pharmacological Activation of SIRT1 to Delay the Onset of Neurodegeneration. **33**, 8951–8960 (2013).
12. Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. Activation of the Protein Deacetylase SIRT6 by Long-chain Fatty Acids and Widespread Deacylation by Mammalian Sirtuins. *J. Biol. Chem.* **288**, 31350–31356 (2013).
13. Seyssel, K. *et al.* Regulation of energy metabolism and mitochondrial function in skeletal muscle during lipid overfeeding in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1254–1262 (2014).
14. Fiorino, E., Giudici, M., Ferrari, A. & Crestani, M. Critical Review The Sirtuin Class of Histone Deacetylases : Regulation and Roles in Lipid Metabolism. 1–11

doi:10.1002/iub.1246

15. Aguilar-Arnal, L., Katada, S., Orozco-Solis, R. & Sassone-Corsi, P. NAD<sup>+</sup>-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 312–318 (2015).
16. Sauve, A. A. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1591–1603 (2010).
17. Ramadori, G. *et al.* Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J. Neurosci.* **28**, 9989–9996 (2008).
18. Heyward, F. D. *et al.* Obesity Weighs down Memory through a Mechanism Involving the Neuroepigenetic Dysregulation of Sirt1. *J. Neurosci.* **36**, 1324–1335 (2016).
19. Calvo-Ochoa, E., Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Morimoto, S. & Arias, C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 1001–8 (2014).
20. 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.* **33**, 1493–1499 (2013).
21. Kwon, B., Lee, H.-K. & Querfurth, H. W. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1402–1413 (2014).
22. Gustavo Vazquez-Jimenez, J. *et al.* Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell. Signal.* **28**, 53–59 (2016).
23. Kreutzenberg, S. V. De *et al.* Downregulation of the Longevity-Associated Protein Potential Biochemical Mechanisms. **59**, (2010).
24. Maesako, M. *et al.* Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A $\beta$  deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **33**, 1011.e11–1011.e23 (2012).
25. Planel, E. *et al.* Insulin Dysfunction Induces In Vivo Tau Hyperphosphorylation through Distinct Mechanisms. **27**, 13635–13648 (2007).
26. Calvo-Ochoa, E. & Arias, C. 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 (2015).
27. Chen, Y., Deng, Y., Zhang, B. & Gong, C. Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease. 1–13 (2014). doi:10.1007/s12264-013-1408-x
28. Schrijvers, E. M. C. *et al.* Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the

- Rotterdam Study. *Neurology* **75**, 1982–7 (2010).
29. El Khoury, N. B., Gratuze, M., Papon, M.-A., Bretteville, A. & Planel, E. Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–18 (2014).
  30. O'Brien, R. & Wong, P. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **1987**, 185–204 (2011).
  31. Zhang, X. & Song, W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- $\beta$  generation. *Alzheimers. Res. Ther.* **5**, 46 (2013).
  32. Sastre, M., Walter, J. & Gentleman, S. M. Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J. Neuroinflammation* **5**, 25 (2008).
  33. Avila-Muñoz, E. & Arias, C. Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia* **63**, 2010–2022 (2015).
  34. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M. & Tessier-Lavigne, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**, 981–989 (2009).
  35. Xu, Y. *et al.* Beta amyloid-induced upregulation of death receptor 6 accelerates the toxic effect of N-terminal fragment of amyloid precursor protein. *Neurobiol. Aging* **36**, 157–168 (2015).
  36. Sun, X., Bromley-Brits, K. & Song, W. Regulation of  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 gene expression and its role in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **120 Suppl** , 62–70 (2012).
  37. Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V. & Ruiz-Albusac, J. M. Insulin in the Brain: Its Pathophysiological Implications for States Related with Central Insulin Resistance, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–21 (2014).
  38. Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W. & Kahn, C. R. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes* **63**, 2232–2243 (2014).
  39. Xu, B. L. *et al.* Comparison of the effects of resveratrol and caloric restriction on learning and memory in juvenile C57BL / 6J mice. **2015**, 1–8 (2015).
  40. Weinberg, R. B., Mufson, E. J. & Counts, S. E. Evidence for a neuroprotective microRNA pathway in amnesic mild cognitive impairment. *Front. Neurosci.* **9**, 1–12 (2015).
  41. Carboni, L. *et al.* Peripheral leukocyte expression of the potential biomarker proteins Bdnf, Sirt1, and Psen1 is not regulated by promoter methylation in Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* **605**, 44–48 (2015).
  42. Ma, L. *et al.* Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. *Brain Res. Bull.* **116**, 67–72 (2015).

43. Maesako, M. *et al.* High fat diet enhances  $\beta$ -site cleavage of amyloid precursor protein (APP) via promoting  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1/adaptor protein 2/clathrin complex formation. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
44. Mastrocola, R. *et al.* Dysregulation of SREBP2 induces BACE1 expression. *Neurobiol. Dis.* **44**, 116–124 (2011).
45. Patil, S., Sheng, L., Masserang, A. & Chan, C. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **406**, 55–59 (2006).
46. Liu, L., Martin, R. & Chan, C. Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol. Aging* **34**, 540–550 (2013).
47. Liu, L., Martin, R., Kohler, G. & Chan, C. Palmitate induces transcriptional regulation of BACE1 and presenilin by STAT3 in neurons mediated by astrocytes. *Exp. Neurol.* **248**, 482–490 (2013).
48. Vandal, M. *et al.* Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A $\beta$  and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* **63**, 4291–4301 (2014).
49. Wang, J. *et al.* Caloric restriction attenuates beta-amyloid neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **19**, 659–661 (2005).
50. Marwarha, G., Raza, S., Meiers, C. & Ghribi, O. Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- $\beta$  genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 1587–1595 (2014).
51. Cao, L., Liu, C., Wang, F. & Wang, H. SIRT1 negatively regulates amyloid-beta-induced inflammation via the NF- $\kappa$ B pathway. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **46**, 659–669 (2013).
52. Chami, L. *et al.* Nuclear Factor- $\kappa$ B Regulates APP and  $\beta$ -Secretases Differently at Physiological and Supraphysiological A $\beta$  Concentrations. *J. Biol. Chem.* **287**, 24573–24584 (2012).
53. Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R. & De Felice, F. G. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **10**, S76–S83 (2014).
54. Chouliaras, L. *et al.* Brain , Behavior , and Immunity Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain Behav. Immun.* **25**, 616–623 (2011).
55. Donmez, G., Wang, D., Cohen, D. E. & Guarente, L. SIRT1 Suppresses  $\beta$ -Amyloid Production by Activating the  $\alpha$ -Secretase Gene ADAM10. *Cell* **142**, 320–332 (2010).
56. Marques, S. C. F. *et al.* Epigenetic regulation of BACE1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice. *Neuroscience* **220**, 256–266 (2012).

57. Chen, C.-H. *et al.* Increased NF- $\kappa$ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**, 77–90 (2012).
58. Berridge, M. V & Tan, A. S. Characterization of the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474–482 (1993).
59. Julio-Amilpas, A., Montiel, T., Soto-Tinoco, E., Gerónimo-Olvera, C. & Massieu, L. Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by  $\beta$ -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 851–860 (2015).
60. Carafa, V., Nebbioso, A. & Altucci, L. Sirtuins and disease: The road ahead. *Front. Pharmacol.* **3 JAN**, 1–6 (2012).
61. Michan, S. & Sinclair, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* **404**, 1–13 (2007).
62. Gertler, A. A. & Cohen, H. Y. SIRT6, a protein with many faces. 629–639 (2013). doi:10.1007/s10522-013-9478-8
63. Walker, J. M. *Sirtuins IN*.
64. Ghosh, S. & Zhou, Z. SIRTain regulators of premature senescence and accelerated aging. *Protein Cell* **6**, 322–333 (2015).
65. Mattson, M. P. & Camandola, S. NF- $\kappa$ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Clin. Invest.* **107**, 247–254 (2001).
66. Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K. & Salminen, A. Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* **25**, 1939–1948 (2013).
67. Mendoza-Oliva, A., Ferrera, P., Fragoso-Medina, J. & Arias, C. Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid- $\beta$  Production in vivo and in vitro. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 631–41 (2015).
68. Azizi, H. & Kalisch, B. Effects of DHA and EGCG on the alpha-secretase mediated processing of EFFECTS OF DHA AND EGCG ON THE ALPHA-SECRETASE MEDIATED PROCESSING OF APP. (2015).
69. Bace1 structure function and evolution Venugopal 2008.pdf.
70. Wang, R. *et al.* Metabolic Stress Modulates Alzheimer's  $\beta$ -Secretase Gene Transcription via SIRT1-PPAR $\gamma$ -PGC-1 in Neurons. *Cell Metab.* **17**, 685–694 (2013).
71. Choi, S. E. *et al.* Elevated microRNA-34a in obesity reduces NAD<sup>+</sup> levels and SIRT1 activity by directly targeting NAMPT. *Aging Cell* **12**, 1062–1072 (2013).
72. Min, S. *et al.* Article Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to



- Tauopathy. *Neuron* **67**, 953–966 (2010).
73. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* **282**, 1–23 (2014).
  74. Vaquero, A., Sternglanz, R. & Reinberg, D. NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* **26**, 5505–20 (2007).
  75. Aranha, M. M., Santos, D. M., Solá, S., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. P. miR-34a Regulates Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PLoS One* **6**, e21396 (2011).
  76. Hage Hassan, R., Bourron, O. & Hajdich, E. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J. Diabetes* **5**, 244–57 (2014).
  77. Futerman, A. H. & Riezman, H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**, 312–318 (2005).
  78. Li, J. *et al.* Nicotinamide ameliorates palmitate-induced ER stress in hepatocytes via cAMP/PKA/CREB pathway-dependent Sirt1 upregulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 2929–2936 (2015).
  79. Cantó, C., Menzies, K. J. & Auwerx, J. NAD<sup>+</sup> Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab.* **22**, 31–53 (2015).
  80. Fukata, Y., Murakami, T., Yokoi, N. & Fukata, M. *Local Palmitoylation Cycles and Specialized Membrane Domain Organization. Current Topics in Membranes 77*, (Elsevier Ltd, 2015).
  81. Peng, T., Thinon, E. & Hang, H. C. Proteomic analysis of fatty-acylated proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **30**, 77–86 (2016).
  82. Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J. & Hermsdorff, H. H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* **244**, 211–215 (2016).
  83. Ciesielska, A. & Kwiatkowska, K. Modification of pro-inflammatory signaling by dietary components: The plasma membrane as a target. *BioEssays* **37**, 789–801 (2015).
  84. Kang, E.-B. *et al.* Neuroprotective Effects of Endurance Exercise against High Fat Diet-Induced Hippocampal Neuroinflammation. *J. Neuroendocrinol.* n/a–n/a (2016). doi:10.1111/jne.12385
  85. Smith, Q. R. & Nagura, H. Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *J. Mol. Neurosci.* **16**, 167–72; discussion 215–21 (2001).
  86. Hamilton, J. a. & Brunaldi, K. A model for fatty acid transport into the brain. *J. Mol. Neurosci.* **33**, 12–17 (2007).
  87. Yi, J. & Luo, J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1684–1689 (2010).

88. Nasrin, N. *et al.* JNK1 Phosphorylates SIRT1 and Promotes Its Enzymatic Activity. **4**, (2009).
89. Gan, L. & Mucke, L. Minireview Paths of Convergence : Sirtuins in Aging and Neurodegeneration Minireview. 2004–2008 (2008).  
doi:10.1016/j.neuron.2008.03.015
90. Chalkiadaki, A. & Guarente, L. High-Fat Diet Triggers Inflammation-Induced Cleavage of SIRT1 in Adipose Tissue To Promote Metabolic Dysfunction. *Cell Metab.* **16**, 180–188 (2012).
91. Pal, M., Febbraio, M. A. & Lancaster, G. I. The Roles of c-Jun NH2 -Terminal Kinases (JNKs) in Obesity and Insulin Resistance. *J. Physiol.* **00**, 1–13 (2015).
92. Singh, V., Gupta, D. & Arora, R. NF- $\kappa$ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures. *Discoveries* **3**, e35 (2015).
93. Thirumangalakudi, L. *et al.* High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J. Neurochem.* **106**, 475–485 (2008).
94. Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K. & Fahrenholz, F. Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J.* **23**, 1643–1654 (2009).
95. Ding, Y. *et al.* Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J. Neurosci.* **28**, 11622–34 (2008).
96. Saftig, P. & Lichtenthaler, S. F. The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog. Neurobiol.* (2015).  
doi:10.1016/j.pneurobio.2015.10.003
97. Endres, K. & Fahrenholz, F. Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp. Brain Res.* **217**, 343–352 (2012).
98. Reiss, K., Cornelsen, I., Husmann, M., Gimpl, G. & Bhakdi, S. Unsaturated fatty acids drive disintegrin and metalloproteinase (ADAM)-dependent cell adhesion, proliferation, and migration by modulating membrane fluidity. *J. Biol. Chem.* **286**, 26931–26942 (2011).
99. Anders, a, Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. & Fahrenholz, F. Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* **15**, 1837–1839 (2001).
100. Moss, M. L. *et al.* The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J. Biol. Chem.* **282**, 35712–35721 (2007).
101. Harris, B., Pereira, I. & Parkin, E. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma

- SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res.* **1296**, 203–215 (2009).
102. Roßner, S., Sastre, M., Bourne, K. & Lichtenthaler, S. F. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression—Implications for Alzheimer’s disease. *Prog. Neurobiol.* **79**, 95–111 (2006).
  103. Tamagno, E., Guglielmotto, M., Monteleone, D., Vercelli, a & Tabaton, M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of  $\beta$ -secretase. *IUBMB Life* **64**, 943–50 (2012).
  104. Venugopal, C., Demos, C. M., Rao, K. S., Pappolla, M. a & Sambamurti, K. Beta-secretase: structure, function, and evolution. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 278–294 (2008).
  105. Faghihi, M. A. *et al.* Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer’s disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat. Med.* **14**, 723–30 (2008).
  106. Katto, J., Engel, N., Abbas, W., Herbein, G. & Mahlknecht, U. Transcription factor NF $\kappa$ B regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1. *Clin. Epigenetics* **5**, 11 (2013).
  107. Li, X., Khanna, A., Li, N. & Wang, E. Circulatory mir-34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany. NY)*. **3**, 985–1002 (2011).
  108. Lee, H. R. *et al.* Cilostazol suppresses  $\beta$ -amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor- $\beta$ . *J. Neurosci. Res.* **92**, 1581–90 (2014).
  109. Cheng, C. *et al.* MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of alzheimer disease-related a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J. Biol. Chem.* **288**, 13748–13761 (2013).
  110. Corbett, G. T., Gonzalez, F. J. & Pahan, K. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1504890112– (2015).