



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS CATABOLIZADORAS DE
LOS AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA DURANTE LA OBESIDAD Y EL
ENVEJECIMIENTO**

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

PRESENTA:
DANIELA SALINAS RUBIO

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LÓPEZ
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN,
INCMNSZ

COMITÉ TUTOR
DR. ÁNGEL ZARAIN-HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA,
UNAM
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR,
UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice:

Resumen

Abstract

1. Introducción

1.1 Obesidad

1.2 Resistencia a la insulina

1.3 Ácidos grasos y resistencia a la insulina

1.4 Generalidades y metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada

1.5 Aminoácidos de cadena ramificada y resistencia a la insulina

1.6 Interacción entre los aminoácidos de cadena ramificada y los ácidos grasos libres

1.7 Alteraciones del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada durante el envejecimiento

1.8 Regulación del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada

1.8.1 Mecanismos generales de la regulación de la expresión de genes de enzimas metabólicas

1.8.2 Regulación de la expresión de enzimas por miRNAs

2. Justificación

3. Hipótesis

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos específicos

5. Metodología

5.1 Modelo animal

5.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa

5.1.2 Calorimetría indirecta

5.2 Aislamiento y cultivo primario de adipocitos

5.3 Evaluación del destino metabólico de la leucina ó el palmitato

5.3.1 Evaluación de la producción de $^{14}\text{CO}_2$

5.3.2 Evaluación de la incorporación de ^{14}C a proteínas

5.3.3 Evaluación de la incorporación de ^{14}C a lípidos

5.4 Determinación de expresión génica de BCAT2 y BCKDH.

5.4.1 Extracción RNA total

5.4.2 Cuantificación RNA

5.4.3 RT-PCR

5.5 Western Blot:

5.6 Determinación de la abundancia relative de miR29b

5.7 Sobreexpresión e inhibición del miR29b en adipocitos mediante transfección

5.8 Desarrollo del plásmido PGL3-control con la region 3'UTR de la BCAT2

5.9 Ensayos de luciferasa

5.10 Análisis estadístico

6. Resultados

6.1 Desarrollo del modelo animal con obesidad inducida con dieta, resistencia a la insulina e inflexibilidad metabólica.

6.2 Evaluación del destino metabólico de la leucina y palmitato en adipocitos.

6.2.1 Efecto del palmitato sobre el destino metabólico de la leucina en adipocitos de ratas control y ratas con dieta alta en grasa

6.2.2 Efecto de la leucina sobre el destino metabólico del palmitato en adipocitos de rata control y ratas con dieta alta en grasa

6.3 Efecto del palmitato sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en adipocitos primarios de ratas control.

6.4 Efecto de la dieta alta en grasa sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas.

6.5 Efecto del palmitato y la leucina sobre las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, gliceroneogénesis y estrés del retículo endoplásmico

6.6 Efecto del envejecimiento sobre el destino metabólico de la leucina en adipocitos de ratas.

6.7 Efecto del envejecimiento sobre la expresión génica de la BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas.

6.8 Cantidad de proteína de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas control y ratas viejas

6.9. Regulación de la BCAT2 y BCKDH por acción de miRNAs

6.10 Efecto del envejecimiento sobre la expresión génica de miR29b en diferentes tejidos de ratas jóvenes y viejas.

6.11 Efecto de la sobreexpresión e inhibición del miR29b sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles.

6.12. Inhibición del miR29b en adipocitos de ratas controles

6.13 Evaluación de la unión del miR29b a la porción 3'UTR de la BCAT2

6.14 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico de la leucina y el palmitato en adipocitos de ratas.

6.14.1 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico de la leucina en presencia de palmitato en adipocitos de ratas.

6.14.2 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico del palmitato en presencia de leucina en adipocitos de rata.

6.15 Efecto del envejecimiento sobre la cantidad de proteína y estado de fosforilación de Akt y S6k en tejido adiposo de ratas.

6.16. Efecto del miR29b sobre la cantidad de proteína y estado de fosforilación de Akt, y S6k en adipocitos de ratas.

6.17 Efecto del miR29b y mTOR sobre el desarrollo de resistencia a la insulina en adipocitos de ratas.

7. Discusión

8. Conclusión

9. Agradecimientos

10. Bibliografía

Resumen

En numerosos estudios se ha observado que durante la obesidad y el envejecimiento existe un aumento de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR). Las concentraciones elevadas de los AACR se han vinculado directamente con la aparición de resistencia a la insulina. El mecanismo por el cuál se elevan los AACR en estas dos condiciones sigue siendo un enigma. Una de las teorías más aceptada hasta la fecha es la disminución de las enzimas encargadas de metabolizarlos, la BCAT2 y la BCKDH, especialmente en el tejido adiposo. Sin embargo, se desconocen los factores que regulan a la baja la expresión de dichas enzimas. La evidencia sugiere que la actividad de BCAT2 y BCKDH puede ser regulada a diferentes niveles. Los resultados de nuestro estudio demuestran que la BCAT2 y la BCKDH son enzimas que se regulan tanto a nivel alosterico por las concentraciones elevadas de palmitato, y a nivel postrancricional por la presencia de un micro RNA, el miR29b. Esta regulación a la baja de las enzimas catabolizadoras de los AACR con lleva a un aumento de los AACR en plasma. La leucina, uno de los AACR, es uno de lo más importantes activadores de la proteína blanco de rapamicina en mamíferos conocida como mTOR (de las siglas en inglés mammalian Target of Rapamicin). Se ha visto que la sobreactivación de mTOR genera una disminución de la fosforilación de Akt y genera resistencia a la insulina. Por lo que en este estudio se propone que la regulación a la baja por la presencia del miR29b, genera un aumento de los AACR, lo cual a su vez causa una disminución de la fosforilación de Akt y S6k, enzimas blanco de la vía de señalización de insulina, a través de mTOR.

Abstract

Several studies have shown that during obesity and aging there is an increase in plasma concentrations of branched chain amino acids (BCCA). High concentrations of BCAAs have been directly linked to insulin resistance. The mechanism by which BCAAs are elevated in these two conditions is still unclear. One of the most accepted theories to this day is the decrease in the catabolic enzymes, BCAT2 and BCKDH, especially in adipose tissue. However, what regulates the expression of these enzymes remains under study. The evidence suggests that the activity of BCAT2 and BCKDH can be regulated at different levels. The results of our study demonstrate that BCAT2 and BCKDH are enzymes that are regulated both at an allosteric level by elevated palmitate concentrations, and at the post-transcriptional level by the presence of a micro RNA, miR29b. This down-regulation of the catabolizing enzymes leads to an increase of the BCAAs in plasma. Leucine, one of the BCAAs, is one important activator of mTOR (the mammalian Target of Rapamycin). Overactivation of mTOR causes a decrease in Akt phosphorylation and generates insulin resistance. Therefore, in this study we propose that the downregulation due to the presence of miR29b, generates an increase in BCAAs, which in turn causes a decrease in the phosphorylation of Akt and S6k, target enzymes of the insulin signaling pathway.

1. Introducción

1.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento del tejido adiposo en el organismo, acompañada de alteraciones metabólicas que predisponen al desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (1) y, por tanto, implica alto costos al sector salud (2). Una de las alteraciones metabólicas que se presentan durante la obesidad es la resistencia a la insulina (RI) que con lleva a una desregulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos (3).

1.2 Resistencia a la insulina

La RI se define como la incapacidad de la insulina para incrementar la entrada y la utilización de la glucosa por los tejidos periféricos, especialmente el tejido adiposo y el músculo (4). Los mecanismos que dan origen a la RI son complejos; sin embargo se sabe que son el resultado de alteraciones en la señalización de insulina (5). La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a un receptor específico localizado en la membrana (6). El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de tirosina (7). El IR es un heterotetrámero compuesto por cuatro subunidades: dos subunidades α y dos subunidades β , las cuales se encuentran unidas por puentes disulfuro (Figura 1).

Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de tirosina (8). En condiciones de no estímulo, las subunidades α ejercen un papel regulador sobre las subunidades β , inhibiendo la capacidad del receptor para autofosforilarse. Una vez que la insulina se une a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de tirosina (8,9). Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se activan las cascadas de señalización que involucran un gran número de interacciones proteicas.

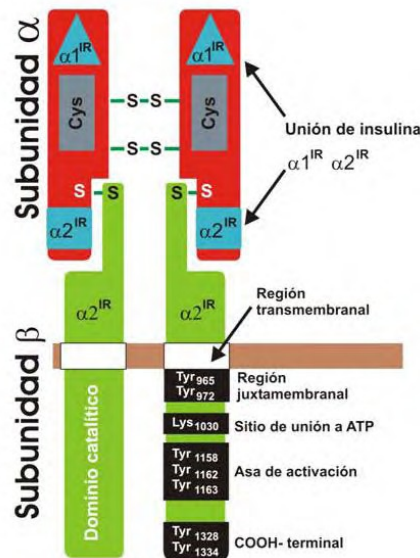


Figura 1: Estructura del Receptor de Insulina. Figura tomada y adaptada de Olicares Reyes JA, Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de insulina.

Una de las vías principales de transducción que es activada por acción de la insulina es la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (10). La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (11). Esta vía se activa una vez que se unen los sustratos del receptor de la insulina (IRS) con el complejo p85/p110 de la PI3-K. La PI3K activada fosforila fosfolípidos de membrana, siendo uno de los principales productos el fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, (PIP3). EL PIP3, activa a la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1), y a la proteína cinasa B ó Akt, las cuales a su vez fosforilan diversas proteínas (Figura 2). Varios estudios han demostrado que en las personas con obesidad se encuentran disminuida la unión de la insulina a su receptor, la fosforilación de los sustratos de los receptores de insulina y la actividad tirosina cinasa (12). Algunas de estas alteraciones se han asociado al aumento de tejido adiposo y a la acumulación de ácidos grasos en tejido hepático y muscular (13).

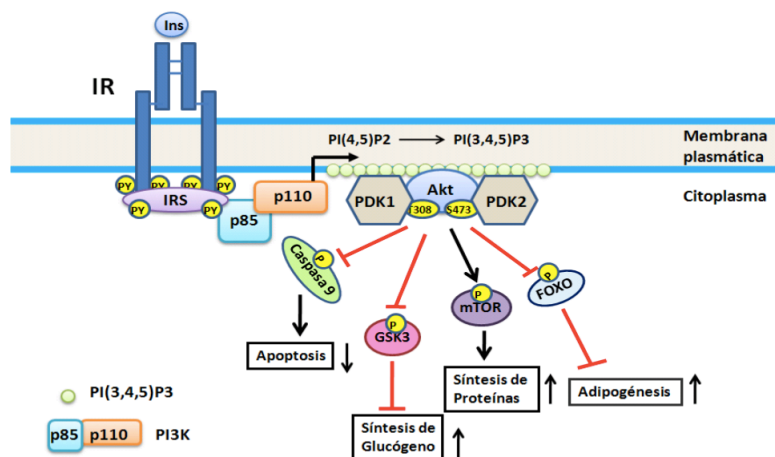


Figura 2: Vía de señalización de la insulina: La insulina se une a su receptor y activa la PI3K, que a su vez activa a AKT Y PDK1 que fosforilan a las proteínas indicadas. Figura tomada y adaptada de Olicares Reyes JA, Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de insulina.

1.3 Ácidos grasos y Resistencia a la insulina

Los ácidos grasos (AG) son cadenas alquílicas que terminan en un grupo carboxilo y que tienen diversas funciones estructurales y/o reguladoras. Una de sus principales funciones es la de proporcionar energía a la célula por medio de un proceso conocido como β -oxidación (14). Este proceso se lleva a cabo dentro de la mitocondria, por lo que para poder ser oxidados, los ácidos grasos deben de entrar a la mitocondria a través de una enzima llamada carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1) (15,16). Esta enzima convierte los acil-CoA en sus respectivas acilcarnitinas, las cuales son transportadas a través de la acilcarnitina translocasa de la membrana mitocondrial externa a la interna. Finalmente, una vez dentro de la mitocondria se lleva a cabo el espiral de la β -oxidación, el cual consta de una secuencia cíclica de cuatro reacciones: oxidación, hidratación, oxidación y tiólisis (Figura 3) (17). Esta secuencia de reacciones va acortando la cadena del ácido graso en dos carbonos formando en cada ciclo acetil CoA, el cuál entra al ciclo de Krebs para ser completamente oxidado (18).

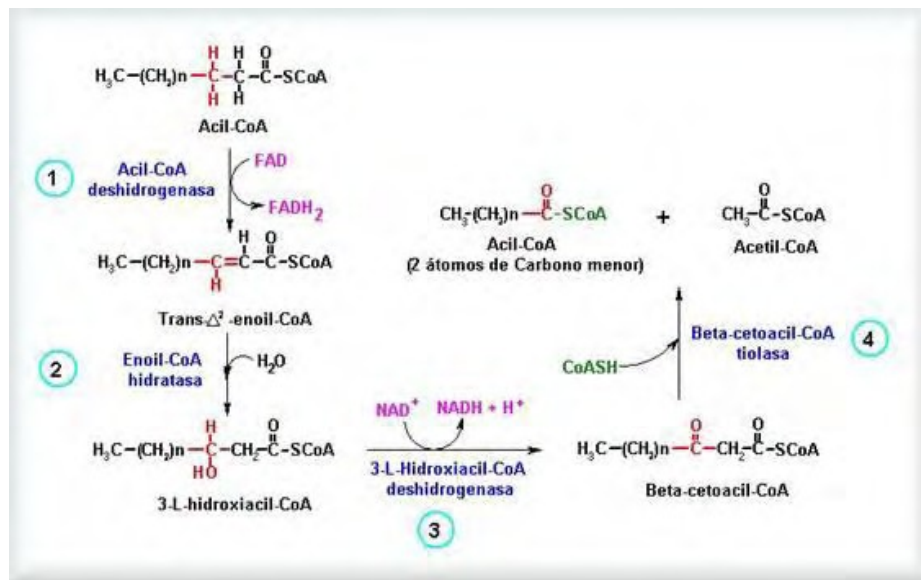


Figura 3: Reacciones que conforman la B-oxidación: oxidación (1), hidratación (2), oxidación (3) y tiolisis (4) de los ácidos grasos dentro de la mitocondria. Figura tomada y adaptada de Garrido Pertierra A. Fundamentos de bioquímica metabólica.

Sin embargo, cuando la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria disminuye o es ineficiente, el exceso de ácidos grasos se acumula como diacilgliceroles (DAG) o pueden dar lugar a ceramidas tanto en hígado como en el músculo esquelético; esto causa un estado patológico de resistencia a la insulina (19) ya que las ceramidas y los DAG interfieren en la vía de señalización de la insulina, inducen estrés oxidativo, e inhiben la captura y almacenamiento de la glucosa (20,21). Estudios realizados en cultivos celulares sugieren que el mecanismo primario por el cual las ceramidas antagonizan la acción de la insulina es por medio de la inhibición de Akt/PKB (22, 23, 24). Por otro lado, se ha visto que los DAG activan la vía PKC, la cual fosforila e inactiva a IRS1, inhibiendo así la vía de PI3-K. De igual manera, el aumento de ácidos grasos libres (AGL) afecta de forma directa el metabolismo de la glucosa en los tejidos (25). Los AGL compiten con la glucosa como fuente de energía. Cuando los AGL se encuentran elevados, el músculo los utiliza preferentemente, y se disminuye la oxidación de glucosa.

Los AGL inhiben también la captación de glucosa dependiente de la insulina a nivel del sistema de transporte y/o fosforilación y la síntesis de glucógeno dependiente de insulina. Al antagonizar a nivel hepático la acción de la insulina, favorecen un estado de resistencia que lleva a un incremento en la síntesis de glucosa endógena. Todo esto da como resultado un estado de hiperglucemia, característico de la RI (26,27,28). En cultivos celulares se ha visto que una alta concentración de AGL incrementan la fosforilación en residuos de serina de los sustratos del receptor de insulina (IRS1) (29). La fosforilación en residuos de serina del IRS1 reduce la fosforilación en los residuos de tirosina del IRS1, suprimiendo de esta manera la señalización de la insulina (29).

Sin embargo, en un estudio realizado por Newgard y colaboradores se demostró que además de los ácidos grasos, los aminoácidos, en especial los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), juegan un papel muy importante en el desarrollo de la RI. En la figura 4 se puede observar una correlación directa entre la concentración de los AACR con la presencia de Resistencia a la Insulina establecida por el valor de HOMA en pacientes con obesidad (30).

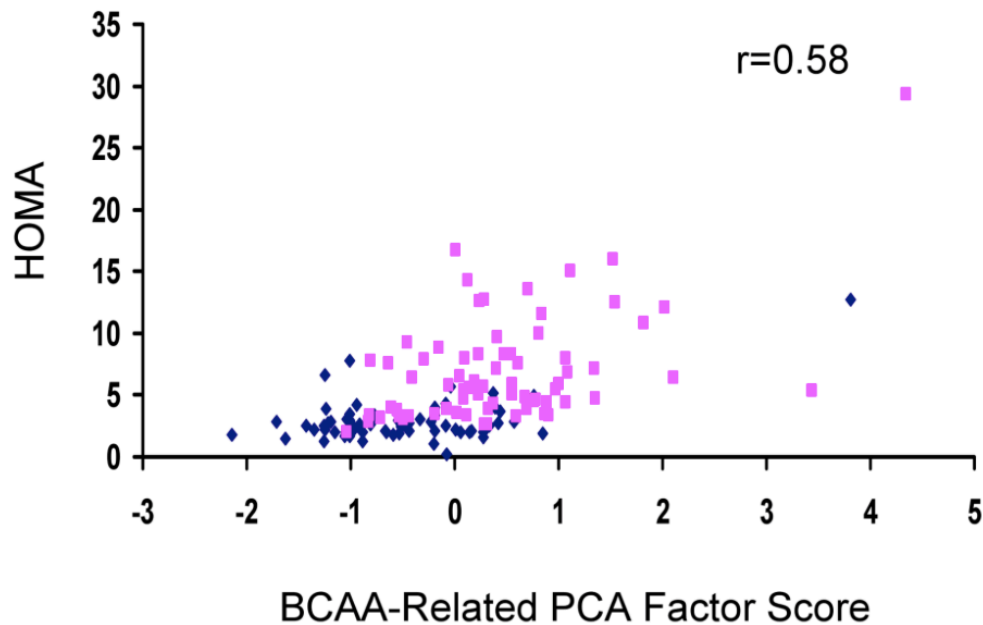


Figura 4: Correlación entre los aminoácidos de cadena ramifica y la sensibilidad a la insulina. La figura muestra la relación entre la sensibilidad a la insulina (HOMA) y un component principal compuesto de metabolitos de los AACR, incluyendo la valina, leucina, isoleucina, y las acilcarnitinas C3 y C5. Figura tomada y adaptada de Newgard et cols.

1.4 Generalidades y metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada

Los AACR son la leucina, isoleucina y valina. Estos aminoácidos conforman alrededor del 20 al 25% de las proteínas de la dieta y se encuentran entre los nueve aminoácidos indispensables para los humanos (31). Los AACR son utilizados principalmente para la síntesis de proteínas y al no existir una reserva especial para ser almacenados, el exceso es metabolizado para ser eliminado (32). El nitrógeno es eliminado vía transaminación, desaminación, y formación de urea; y los esqueletos de carbono pueden ser oxidados hasta CO_2 y H_2O o almacenados como hidratos de carbono vía gluconeogénesis (AA glucogénicos), o como ácidos grasos vía síntesis del ácido graso (AA cetogénicos). Los primeros pasos en el

catabolismo de los AACR son comunes para los tres aminoácidos, se llevan a cabo en la mitocondria, e involucran a dos complejos enzimáticos: 1) la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAT2) que da lugar a los α -cetoácidos de cadena ramificada (33); y 2) la deshidrogenasa de los α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKDH) que dan lugar a los esteres de CoA de cadena ramificada (Figura 5). El metabolismo posterior diverge existiendo una vía con enzimas en particular para cada uno de los esteres de CoA, como la isovaleril CoA deshidrogenasa (IVDH) en el caso del ester derivado de la leucina, hasta que son finalmente incorporados al ciclo de Krebs o dan lugar a los cuerpos cetónicos (14). La leucina da lugar a cuerpos cetónicos, por lo que se dice que es un aminoácido cetogénico. La isoleucina por otro lado es un aminoácido tanto cetogénico como glucogénico ya que además de producir acetil CoA puede degradarse hasta succinil CoA, un precursor de la glucosa. Finalmente la valina es un aminoácido glucogénico ya que su degradación también produce precursores intermedios que dan lugar a la síntesis de glucosa (Figura 5).

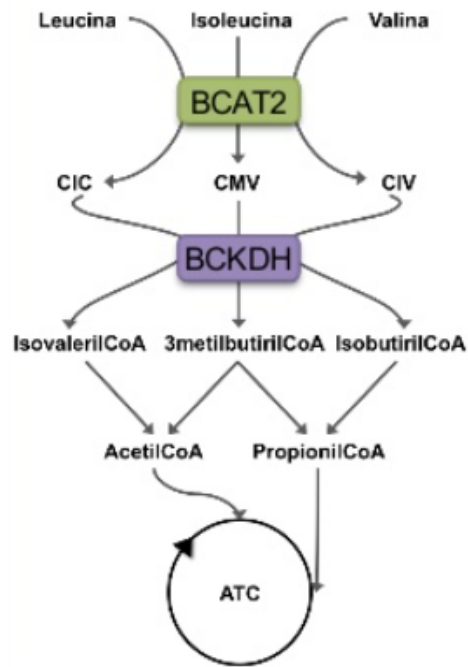


Figura 5: Catabolismo de los AACR dentro de la mitocondria.

Los AACR se oxidan fundamentalmente en los tejidos periféricos, especialmente en el músculo y tejido adiposo. El hígado posee una concentración menor de BCAT2, por lo que casi no se lleva a cabo la oxidación de los AACR en este tejido (34). Por otro lado, el músculo expresa tanto BCAT2 como BCKDH por lo que los AACR pueden oxidarse por completo en el hígado (Figura 6A). Recientemente, el papel del tejido adiposo en el metabolismo de los AACR fue reconocido. En un estudio publicado en el Journal of Biological Chemistry, Herman y sus colaboradores demostraron por primera vez la capacidad del tejido adiposo para metabolizar los AACR utilizando un ratón deficiente de BCAT2 (BCAT2^{-/-}) (35). Los ratones BCAT2^{-/-} presentan una elevación de 10 a 30 veces en las concentraciones plasmáticas de AACR (Figura 6B). De manera interesante, al transplantar tejido adiposo de un ratón silvestre a los ratones BCAT2^{-/-}, con lo cual se restablece la

expression de BCAT2 exclusivamente en el tejido adiposo, la concentración plasmática de los AACR disminuye en comparación con un ratón BCAT2^{-/-} sin transplante (Figura 6C).

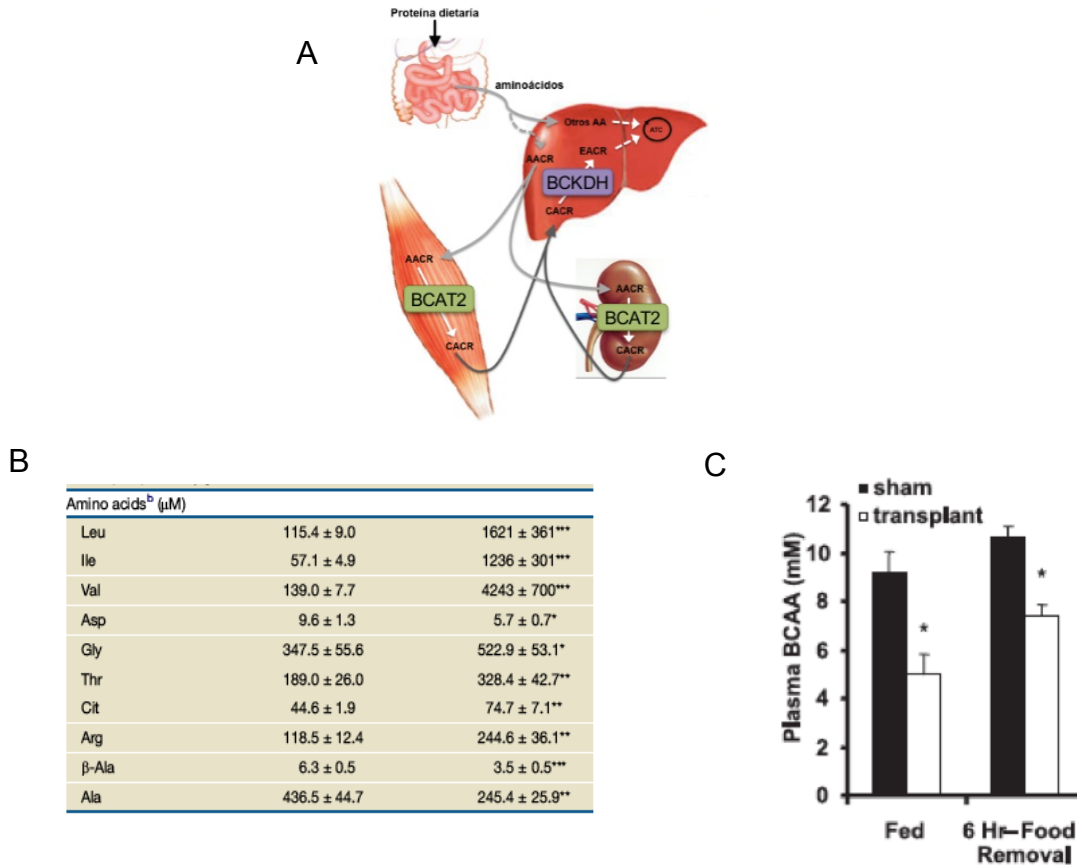


Figura 6: A) Tejidos en los que se encuentra presente la BCAT2 y la BCKDH B) Los ratones deficientes de BCAT2 (BCAT2^{-/-}) presentan mayores concentraciones de AACR. C) Al transplantar tejido adiposo de un ratón silvestre a los ratones BCAT2^{-/-} (transplant) disminuyen la concentración plasmática de los AACR en comparación con un ratón BCAT2^{-/-} sin transplante (sham).

1.5 Aminoácidos de cadena ramificada y resistencia a la insulina

En estudios recientes se ha observado que los pacientes con obesidad tienen un incremento de los AACR que además presenta una relación linear significativa con el desarrollo y aparición de la RI (30). Además, el suministrar AACR en el contexto de una dieta alta en grasa genera una mayor intolerancia a la glucosa acompañado de una disminución de la fosforilación de AKT indicando el desarrollo de resistencia a la insulina (Figura 7).

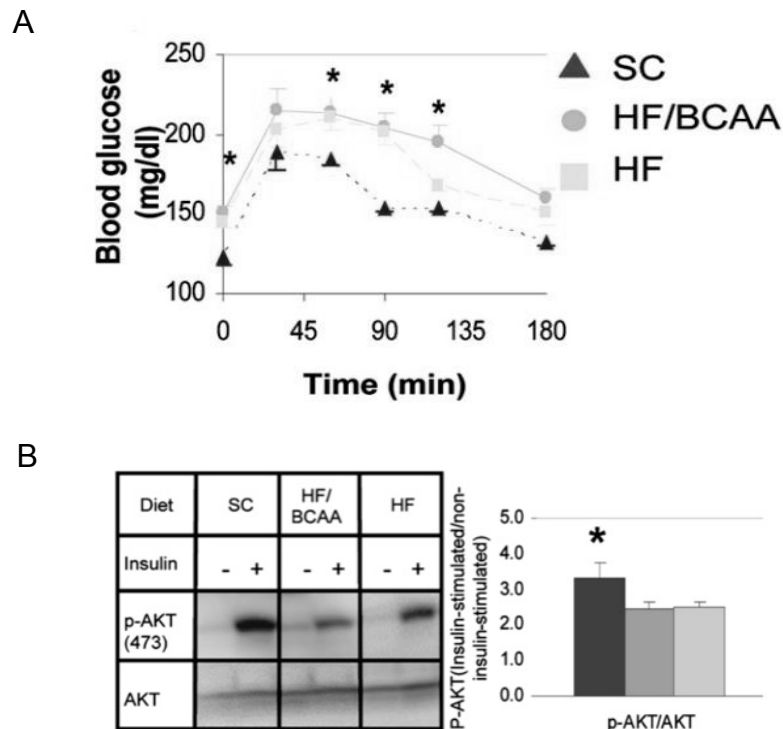


Figura 7: Efecto de la suplementación de AACR en la tolerancia a la glucosa y en la señalización a la insulina. Las ratas fueron alimentadas con una dieta chow (SC), dieta alta en grasa (HF) o dieta alta en grasa suplementada con AACR por 12-16 semanas (HF/BCAA). a) Curva de tolerancia a la glucosa. b) Western blot de p-AKT. Figura tomada y adaptada de Newgard y col.

Uno de los mecanismos propuestos por el cual los AACR elevados podrían generar resistencia a la insulina es a través de la vía mTOR. La leucina, uno de los AACR, es uno de los más importantes activadores de la proteína blanco de rapamicina en mamíferos conocida como mTOR (de las siglas en inglés mammalian Target of Rapamicin). mTOR regula varios procesos fisiológicos dentro de los cuales se encuentra la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, el metabolismo de lípidos e incluso la señalización de insulina. (36). Específicamente, mTOR fosforila al IRS1 en un residuo de serina inhibiendo su función, por tanto, una sobreactivación de mTOR por las elevadas concentraciones de leucina con lleva a la resistencia a la insulina. Sin embargo la evidencia en ensayos tanto in vitro como in vivo sugieren que la resistencia a la insulina generada por los AACR también puede ser resultado de la interacción con otros metabolitos como los AGL.

1.6 Interacción entre los AACR y los AGL.

El metabolismo de los AACR y los ácidos grasos está relacionado, ya que ambas vías catabólicas convergen en la mitocondria en el mismo punto, la producción de acetil-CoA (Figura 8).

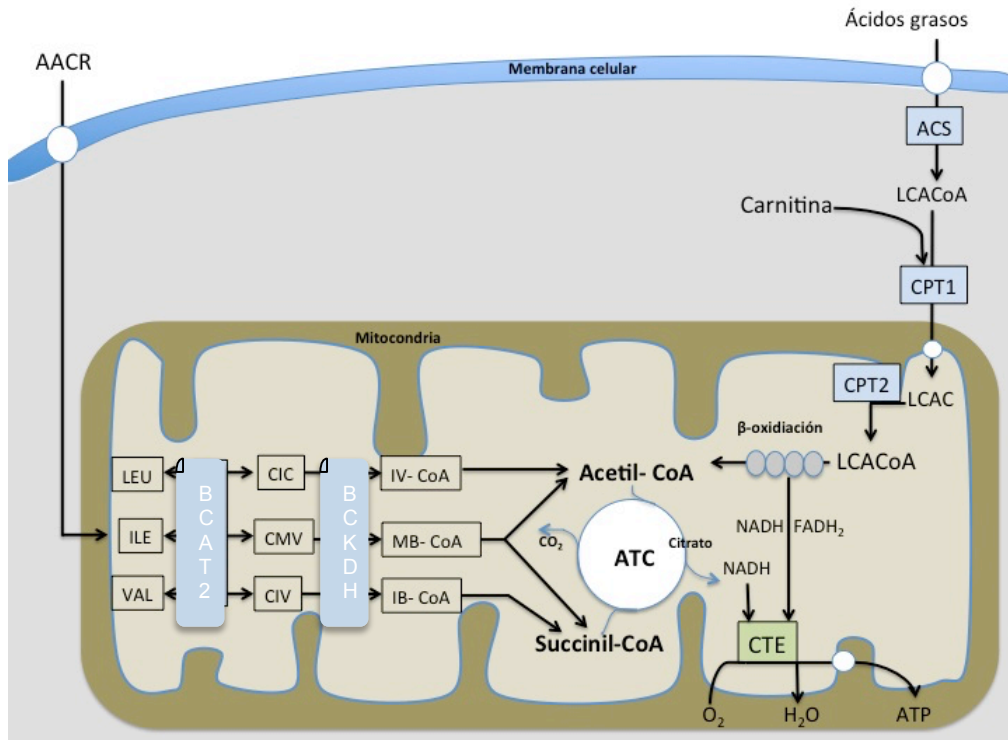


Figura 8: El catabolismo de los AACR y los AG convergen en la mitocondria en la producción de acetil-CoA.

En la obesidad existe un incremento tanto en la concentración de los AGL como de los AACR. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha estudiado como se altera el metabolismo de cada uno por el incremento del otro. Para obtener evidencia de que los AGL puedan afectar el metabolismo de los AACR y viceversa, se realizó un análisis de la expresión de los genes que codifican para las diversas enzimas involucradas en el metabolismo de los AGL y los AACR utilizando una base de datos de microarreglos de expresión de la población de referencia genética BXD. Una población de referencia genética esta conformada por varias cepas de ratones con una amplia variedad genética entre ellas, semejante a la variabilidad genética presente en los humanos, ampliamente caracterizada y son utilizadas para el estudio del efecto de diferentes genotipos sobre el fenotipo. La población BXD es

un una familia de diferentes cepas derivadas de la cruce de ratones C57BL/6 y ratones DBA/2J por 20 o más generaciones consecutivas. Las cepas de ratones generadas presentan heterogeneidad genética entre ellas, sin embargo, cada una de las cepas de esta población presentan una heterogeneidad intrínseca residual menor al 2%, por lo que se pueden considerar como genéticamente idénticos lo que hace reproducible los estudios. A partir de esta población de referencia genética se ha generado una base de datos que contiene una extensa cantidad de datos de mRNA, proteínas, metabolitos y fenotipos que están disponibles en línea en la página www.genenetwork.org.

Dentro del análisis realizado, encontramos que la expresión del ARNm de CPT1 está inversamente correlacionada con el ARNm de la isovaleril-CoA deshidrogenasa (IVDH) en el hígado de 41 cepas de la población BXD (Figura 9).

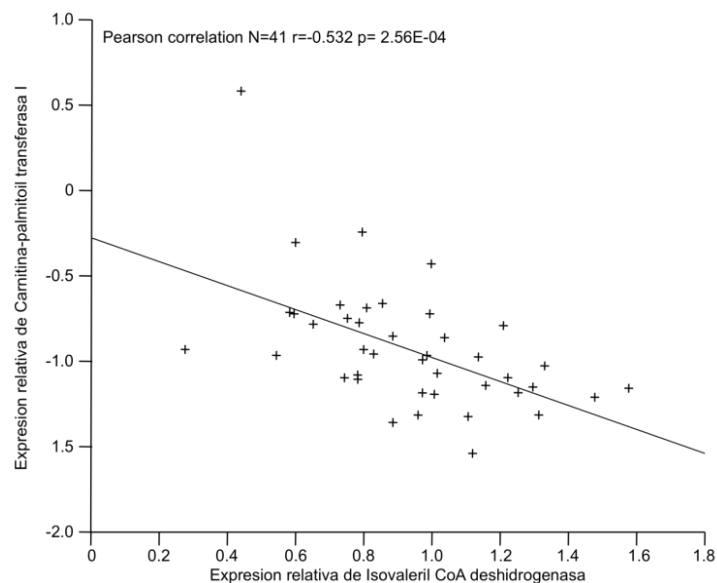


Figura 9: Correlación entre el ARNm de la IVDH y la CPT1 en hígado de 41 cepas de la población de referencia genética BXD. Realizada en genenetwork.org.

De igual manera, encontramos que la expresión de BCAT2 y BCKDHA se correlaciona positivamente con la de Enoyl-CoA Hidratasa/3 Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (EHHADH) y Acil-Co deshidrogenasa de cadena larga (ACADL) en el tejido adiposo peritoneal de rata de la población de referencia genética HXB/BXH (Figura 10). Dado que la expresión de las enzimas catabólicas de los AACR o AGL son indicativos del nivel de oxidación de sus respectivos sustratos, las correlaciones observadas entre estas enzimas sugieren una interacción entre la oxidación de la leucina y la oxidación de palmitato (37).

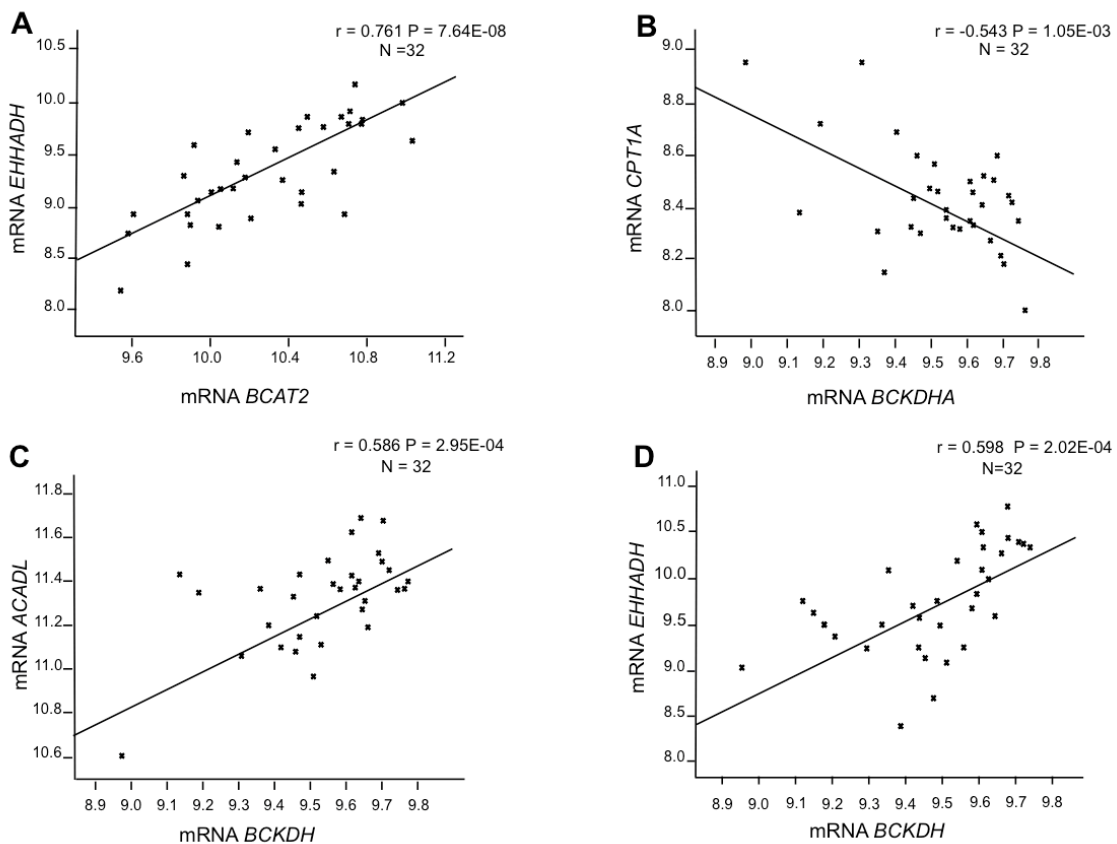


Figura 10: Correlación entre el ARNm de (A) BCAT2 y la EHHADH, (B) BCKDHA y CPT1A, (C) BCKDH y ACADL y (D) BCKDH y EHHADH en tejido adiposo peritoneal de rata de la población de referencia genética HXB/BXH. Realizada en genenetwork.org.

Las correlaciones observadas sugieren que las concentraciones elevadas de los AGL pueden impactar el metabolismo de los AACR y viceversa. Para probar esta hipótesis, durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura, se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de palmitato o leucina sobre el destino metabólico de la [U-¹⁴C]-leucina o del [1-¹⁴C]-palmitato en adipocitos 3T3-L1 (Figura 11). En condiciones basales en los adipocitos 3T3-L1, la leucina se utiliza en mayor cantidad en la síntesis de lípidos, después para la síntesis de proteínas y en menor proporción oxidada por competo. Interesantemente, el palmitato incrementó la oxidación de la leucina y disminuyó la incorporación de la leucina tanto a los lípidos como a las proteínas. Por otro lado, en condiciones basales en los adipocitos 3T3-L1, el palmitato se utiliza altamente en la síntesis de lípidos, después incorporado a la fracción proteica y menor cantidad oxidado. Las concentraciones crecientes de leucina disminuyeron la oxidación del palmitato y su incorporación a lípidos y proteínas. Estos resultados sugieren que efectivamente la leucina puede modificar el destino metabólico del palmitato y viceversa. Sin embargo, se desconoce si estos efectos se preservan en un adipocito en condiciones normales y si se modifican en adipocitos en condiciones de obesidad inducida por dieta así como los mecanismos involucrados en el proceso.

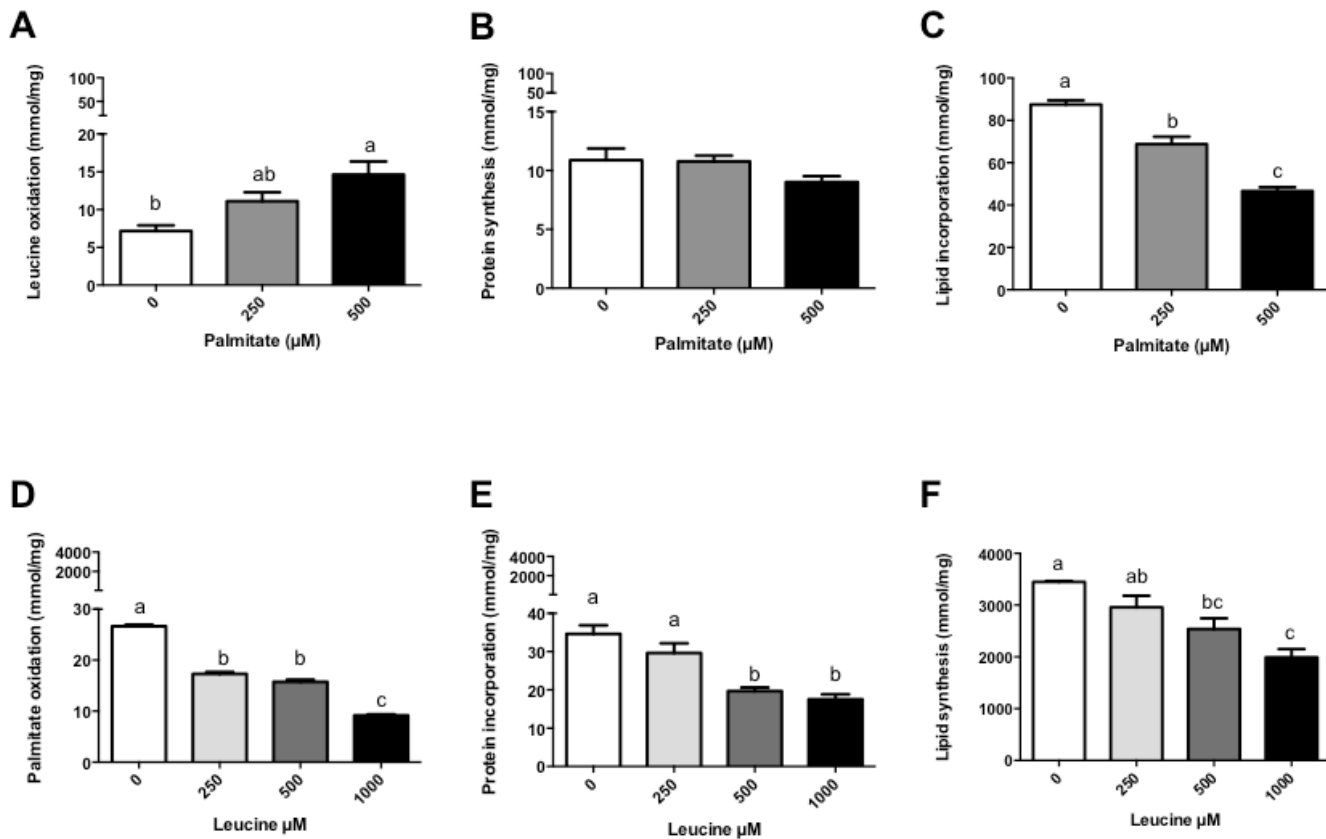


Figura 11: Destino metabólico de la leucina y el palmitato en adipocitos 3T3-L1. Las células se incubaron durante 3 h con concentraciones creciente de palmitato/leucina y posteriormente se evaluó: (A) oxidación, (B) incorporación a proteínas, e (C) incorporación a lípidos a partir de la [U-¹⁴C]-leucina, y la (D) oxidación, (E) incorporación a proteínas, y (F) síntesis de lípidos a partir del [1-¹⁴C]-palmitato. Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media (SEM) de tres ensayos independientes (n=3) y fueron analizados con ANOVA de una vía. (a>b a una p<0.05

1.7 Alteraciones del metabolismo de los AACR durante el envejecimiento.

El envejecimiento es una etapa de la vida que se acompaña de profundos cambios metabólicos, y que se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica. La pérdida progresiva y el deterioro metabólico se ha asociado a ciertas patologías, entre ellas, la resistencia a la insulina; sin embargo, se desconocen los mecanismos que dan lugar a la resistencia a la insulina durante esta etapa de la vida. En 2011, Auwerx et al caracterizaron los aspectos clínicos, moleculares y metabólicos del envejecimiento en ratones para tener un mayor entendimiento del deterioro metabólico durante el envejecimiento (38).

Dentro de las vías afectadas en ratones viejos se encuentran la vía de oxidación de la glucosa, los ácidos grasos y el catabolismo de los AACR. Como se puede observar en la figura 12A existe un incremento en plasma de algunos AG y de los tres AACR en los ratones viejos en comparación con los jóvenes. Además, el aumento en la concentración de AACR es acompañado por una disminución en la cascada de fosforilación de la insulina (Figura 12B).

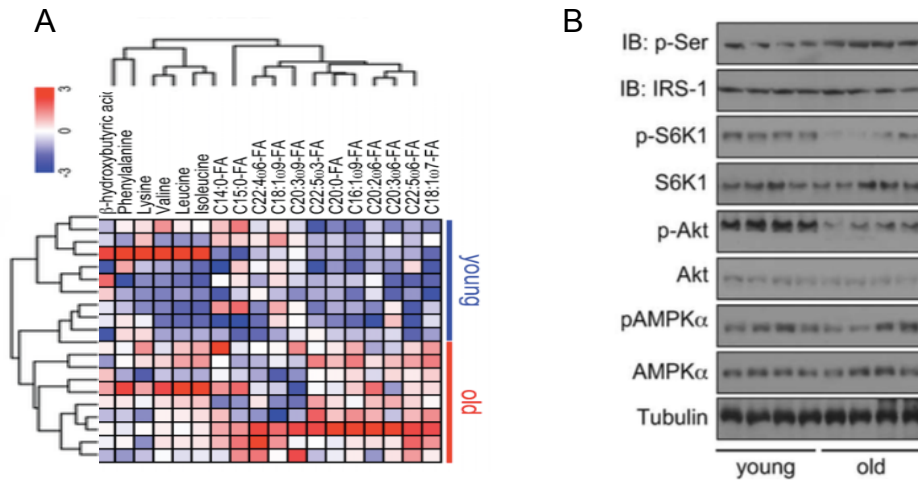


Figura 12: A) Mapa de calor de las metabolitos afectados en los ratones viejos vs. Jóvenes. B) Western Blot de proteínas cinasas implicadas en la cascada de señalización de la insulina en hígado de ratones jóvenes y viejos.

Una de las causa por las que se presenta la resistencia a la insulina durante el envejecimiento puede ser la reducción en el catabolismo de los AACR, ya que el aumento de las concentraciones plasmáticas de los AACR se ha asociado con la resistencia a la insulina, como se menciona anteriormente para pacientes obesos. Sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo que altera el metabolismo de los AACR durante el envejecimiento.

1.8 Regulación del metabolismo de los AACR.

La concentración de los AACR es determinada en parte por el nivel de expresión y actividad de la enzima BCAT2 y BCKDH. En varios estudios se ha reportado como

la expresión de BCAT2 y BCKDH se encuentra disminuida en el tejido adiposo de modelos murinos e incluso en pacientes con obesidad (Figura 13) (39,40).

Sin embargo, hasta la fecha se desconoce porque disminuyen estas enzimas. Para poder plantar una hipótesis es necesario comprender los mecanismos de regulación generales de la expresión de enzimas metabólicas.

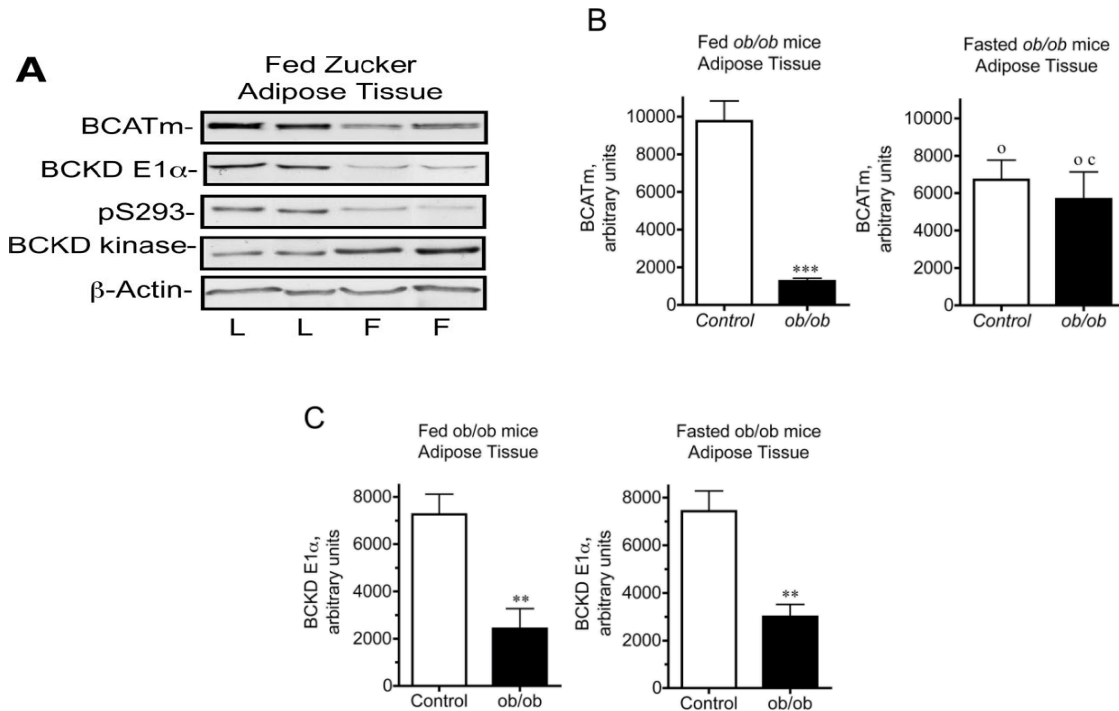


Figura 13. Expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de los BCAA. A) en tejido adiposo de ratas genéticamente obesas (F) y delgadas (L). B) BCATm en tejido adiposo de ratones control y ratones *ob/ob*. C) BCKDH en tejido adiposo de ratones control y ratones *ob/ob*. Figuras tomadas y adaptadas de She et al; 2007.

1.8.1 Mecanismos generales de regulación de la expresión de genes de enzimas metabólicas.

Una de las características esenciales del metabolismo celular, es que a pesar de su enorme complejidad, este presenta una regulación precisa. Dicha regulación se basa principalmente en el control de las enzimas encargadas de llevar a cabo cada una de las reacciones metabólicas, principalmente aquellas enzimas que catalizan reacciones irreversibles. La actividad de las enzimas puede verse modulada a dos niveles diferentes: a) síntesis de la enzima, determinado por el control transcripcional y b) conformación enzimática, determinada por el control postraduccional. El control transcripcional es el que regula la transcripción y que afecta directamente el nivel de expresión de las enzimas a nivel de mRNA e implica la existencia de proteínas reguladoras que incluyen factores de transcripción. Además, a nivel postranscripcional se encuentran los miRNA los cuales se describirán con mayor detalle más adelante. Por otro lado, el control postraduccional, es aquel que se encarga de modificar la conformación tridimensional de la enzima a través de la adición de grupos funcionales a ciertos aminoácidos o a la presencia o ausencia de los sustratos o productos de la reacción enzimática. De esta manera, las enzimas pueden operar entre dos estados: activo e inactivo en función del control alosterico y las modificaciones postraduccionales. El control alostérico depende de las propiedades cinéticas de la proteína y se refiere a la actividad de la enzima cuando se une a un activador o inhibidor, que a menudo es el sustrato o producto de la enzima en sí. Las

modificaciones postraduccionales ocurren mediante cambios químicos e inducen una gran variedad de cambios estructurales y funcionales por lo que constituyen un mecanismo esencial en la regulación. Estas modificaciones pueden ser de muchos tipos como la escisión proteolítica, la fosforilación, glucosilación, acilación, acetilación, sumoilación, ubiquitinación, entre otras (41). En este trabajo nos enfocaremos en los moduladores de la expresión génica a nivel postranscripcional que han captado la atención de muchos en los últimos años, los miRNAs, ya que participan ampliamente en el control metabólico.

1.8.2 Regulación de la expresión de enzimas por miRNAs.

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes que participan en la regulación de la expresión génica. Son fragmentos cortos de aproximadamente 19 a 25 nucleótidos que se unen mediante el apareamiento a secuencias complementarias en la region 3' no traducida (3'UTR) de RNAs mensajeros específicos y que pueden interferir con la síntesis de proteínas (42). Dependiendo de la unión, ya sea parcial o completa, desencadenan la degradación del ARNm o inhiben su traducción a proteína. Los miRNAs son transcritos por la Polimerasa II como fragmentos de RNA mucho mas grandes que los propios miRNAs, y estos se llaman pri-miRNAs. Posteriormente, los pri-miRNAs son procesados en el núcleo por una enzima llamada Drosha en conjunto con DGCR8/Pasha. El procesamiento de estas enzimas, Drosha y Pasha produce segmentos de aproximadamente 70 nucleótidos, los cuales forman estructuras tipo stem-loops, y a estos nuevos segmentos se les conoce como pre-miRNAs. Los pre-miRNAs son exportados del

núcleo por la exportina 5 y finalmente son procesados por Dicer, que libera un dúplex de RNA de doble cadena el cual se incorporará al complejo miRISC, en el cual se retiene la hebra del miRNA maduro y de esta manera el miRNA ya es capaz de interactuar con sus genes Diana (Figura 14) (43).

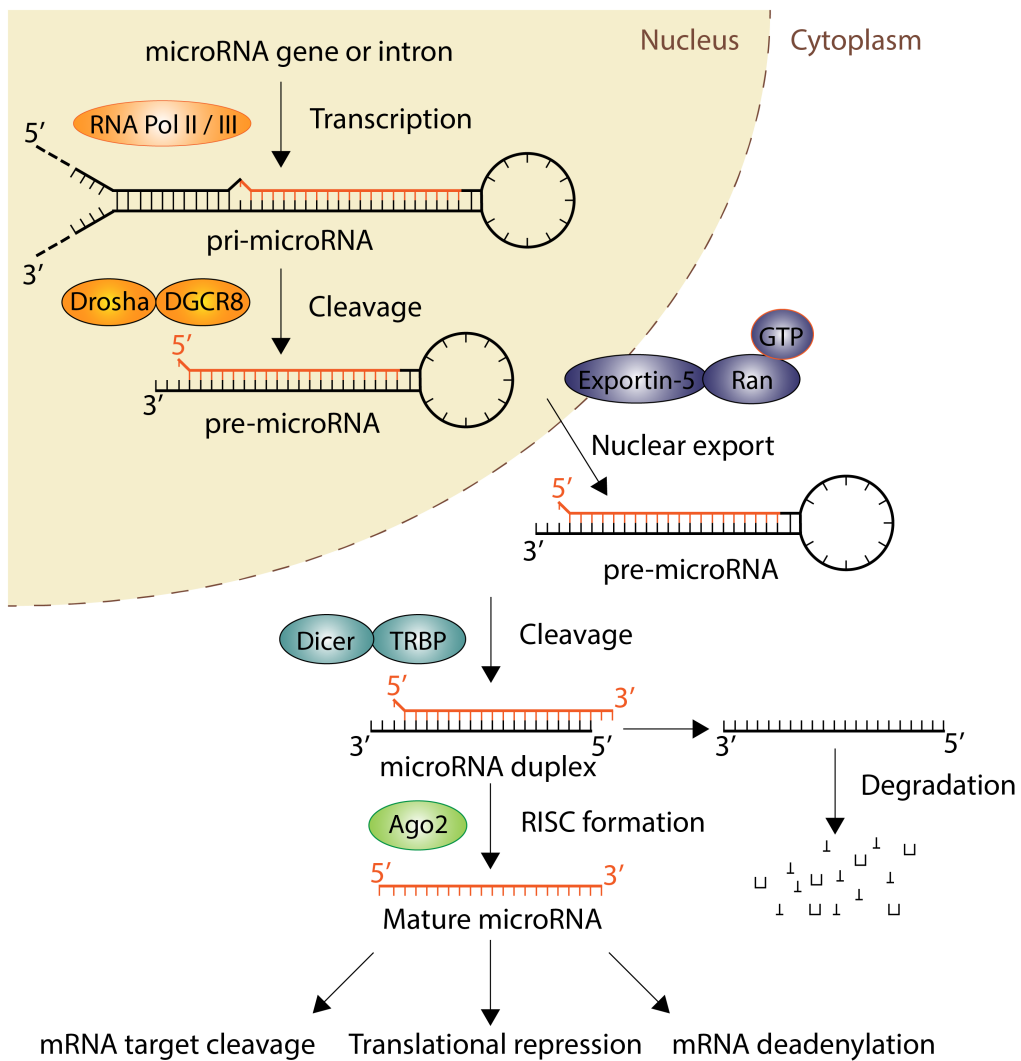


Figura 14: Procesamiento de los miRNAs. Imagen tomada y adaptada de Nature Cell Biology, 2009

Existe una vasta evidencia que sugiere que los miRNAs están desregulados durante el envejecimiento y la obesidad (44). Entre los perfiles de expresión de miRNAs, se ha visto que la familia miR29 se encuentra regulada a la alta en varios tejidos de ratones viejos, así como en modelos de ratones con diabetes (45). Curiosamente, en 2005, Mersey et al. probó que el miR29b está implicado en la regulación del catabolismo de los AACR, ya que un aumento en la cantidad del miR29b disminuye la actividad de la BCKDH (46) (Figura 15A). Adicionalmente, en un análisis bioinformático utilizando programas bioinformáticos capaces de predecir la unión de cierto miRNA a un RNAm blanco como TargetScan, Pictar y microRNA.org, se encontró que efectivamente el miR29b se puede unir a la región 3' UTR de la BCAT2 y la BCKDH. (Figura 16).

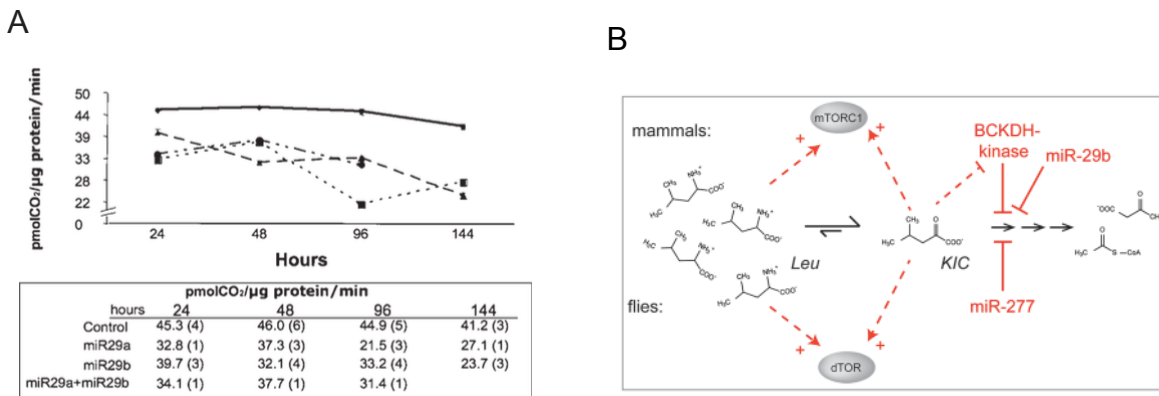


Figura 15. Implicación del miR29b en la regulación del catabolismo de los AACR: A) Actividad total de BCKDH en células HEK293 transfectadas con miR29a y miR29b. B) Las moscas *Drosophila* utilizan el miR-277 para el control del catabolismo de los AACR, en humanos el complejo de BCKDH es controlado tanto por la BCKDH cinasa como por el miR-29b. Figura tomada y adaptada de Förstemann et al 2012 y Mersey et al; 2005.

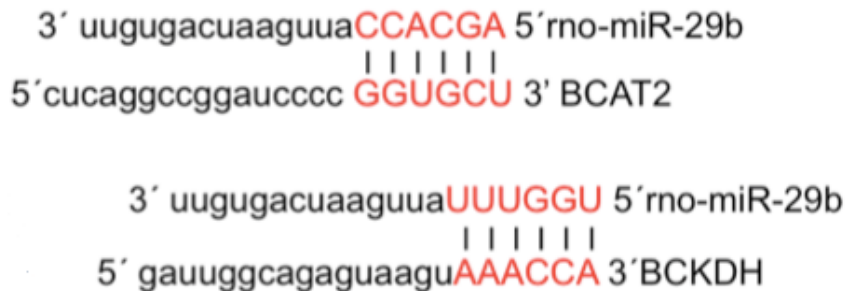


Figura 16: Secuencia de nucleótidos del miR29 señalado en rojo el apareamiento predicho a la porción 3'UTR de BCAT2 y BCKDH utilizando los programas TargetScan, PicTar y microRNA.

2. Justificación

Un aumento en la concentración plasmática de los aminoácidos de cadena ramificada presenta una asociación positiva con el desarrollo de resistencia a la insulina durante la obesidad y posiblemente en el envejecimiento. Las enzimas involucradas en el catabolismo de los AACR se encuentran disminuidas en el tejido adiposo, principalmente la BCAT2 y BCKDH, dando como resultado el incremento de estos aminoácidos en plasma. Por lo tanto, entender los mecanismos que conducen a la disminución en la actividad de BCAT2 y BCKDH podría generar nuevas aproximaciones terapéuticas que coadyuven a un mejor manejo de la resistencia a la insulina. La evidencia sugiere que la actividad de BCAT2 y BCKDH puede ser regulada en dos niveles. El primero a través de la presencia de otros metabolitos como son los AGL que podrían alterar la regulación alosterica de las enzimas reflejándose en cambios en el catabolismo y destino metabólico de los AACR. El segundo por la presencia del miR29b que modificaría la expresión de BCAT2 y BCKDH y por tanto el catabolismo de los AACR.

3. Hipótesis

El catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en tejido adiposo de ratas con dieta alta en grasa y durante el envejecimiento disminuye por un incremento en las concentraciones de palmitato y por un incremento en la presencia del miRNA29b lo que provoca una menor expresión de las enzimas BCAT2 y BCKDH.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Determinar los mecanismos de regulación de las enzimas catabolizadoras de los AACR durante la obesidad y el envejecimiento.

4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar si la presencia de diferentes concentraciones extracelulares de palmitato (0,250 y 500, 1000 μ M) afecta la oxidación, incorporación a lípidos y/o a proteínas de la leucina en adipocitos normales y de ratas con dieta alta en grasa.

2. Determinar si la presencia de diferentes concentraciones extracelulares de leucina (0, 250 y 500, 1000 μM) afecta la oxidación, incorporación a lípidos y/o a proteínas del palmitato en adipocitos normales y de ratas con dieta alta en grasa.
3. Determinar si los cambios en el destino metabólico de la leucina por el palmitato están asociados con cambios en la expresión génica de las enzimas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada principalmente BCAT2 y BCKDH a corto plazo.
4. Determinar si los cambios en el destino metabólico de la leucina están asociados con cambios en la expresión génica de BCAT2 y BCKDH por el consumo de dietas altas en grasa a largo plazo.
5. Determinar el efecto del palmitato y la leucina sobre las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, gliceroneogénesis y estrés del retículo endoplásmico.
6. Determinar si el destino metabólico de la leucina se modifica por la edad.
7. Evaluar si los cambios en el destino metabólico de la leucina por la edad están asociados con cambios en la expresión génica de BCAT2 y BCKDH.

8. Evaluar el efecto de la edad y obesidad sobre la expresión del miR29b.

9. Determinar si el miR29b participa en la regulación de BCAT2 y BCKDH mediante el uso de inhibidores e imitadores del miR29b.

10. Comprobar si el miR29b se une a la porción 3'UTR de BCAT2 y de la BCKDH por medio de ensayos de luciferasa.

11. Determinar si la sobreexpresión del miR29b y la disminución en la señalización de la insulina, específicamente la disminución en la fosforilación de Akt, se debe a una sobreactivación de mTOR.

5. Metodología:

5.1 Modelo animal

Se utilizaron 12 ratas de la cepa Sprague Dawley macho (4 semanas de edad) provenientes de Envigo (Ciudad de México) y se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en jaulas de microaislamiento en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Las ratas se dividieron en dos grupos de 6 ratas cada uno. Un grupo fue alimentado con dieta control CD (n=6), y el otro recibió una dieta alta en grasa HFD (n=6). La dieta control contenía 18.7% kcal de proteína (caseína), 69.3% kcal carbohidratos (dextrina, sacarosa e inulina) y 12% kcal de grasa (aceite de soya), y la dieta alta en grasa contenía 18.7% kcal de proteína (caseína), 36.4% kcal carbohidratos (dextrina, sacarosa e inulina) y 45% kcal de grasa (aceite de soya y manteca de cerdo). A todas las ratas se les proporcionó agua y alimento ad libitum durante 6 meses. A la semana 16 se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, y a la semana 17 se les realizó una calorimetría indirecta para evaluar su estado metabólico. Al final del estudio, se sacrificaron y se obtuvieron los tejidos adiposos epididimales para obtener adipocitos primarios. Todos los procedimientos con los animales fueron realizados de acuerdo con la Política de Servicios de Salud Pública sobre Atención Humana y Uso de Animales de Laboratorio. El protocolo fue autoziado por el Comité de Ética y de Investigación Animal del INCMNSZ.

5.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa

Para determinar el desarrollo de resistencia a la insulina se realizó una curva de tolerancia a la glucosa en los ratones obesos y control. Los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con una solución de glucosa al 20% a una concentración de 2.0 mg/kg del peso corporal y la glucosa sanguínea la cual fue evaluada a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la inyección con ayuda de un glucómetro Acutrend Sensor Roche.

5.1.2 Calorimetría indirecta

La calorimetría indirecta es un método para evaluar el gasto energético y el coeficiente respiratorio (RER) a partir de la determinación del consumo de O_2 y la producción de CO_2 . El RER, que es la relación entre el volumen de CO_2 producido y el volumen de O_2 consumido, es un indicativo de la cantidad de hidratos de carbono o lípidos que son oxidados para proveer energía. Un valor de RER de 1 nos indica que se están oxidando totalmente hidratos de carbono, mientras que un valor de RER de 0.7, nos indica que se están oxidando totalmente lípidos. El gasto de energía se midió por calorimetría indirecta en un sistema de monitoreo de animales de laboratorio Oxymax (CLAMS) (Columbus Instruments, Columbus OH). Este sistema permite monitorear el consumo de oxígeno en animales. El sistema de medición requiere de la remoción del vapor de

agua, el cual interactúa con el sensor de oxígeno y del dióxido de carbono y para esto se emplea una columna de vidrio rellena con SO₄CA anhidro (agente DrieRite) y con NaOH-CaO. Los animales fueron alojados individualmente durante 48 h en jaulas de plástico con sistema de flujo abierto conectado a un CLAMS. Los animales fueron aclimatados durante 24 h, en ayuno durante 12 h en el período de luz y alimentados durante el período oscuro. A lo largo de la prueba, el consumo de O₂ (VO₂ mL / Kg / h) y la producción de CO₂ (VCO₂, mL / Kg / h) se midieron secuencialmente durante 90 segundos. El consumo total de O₂ se calculó y se informó como VO₂ mL / Kg / h. La relación de intercambio respiratorio (RER) se calculó como la relación promedio de CO₂ producido a O₂ inhalado (VCO₂ / VO₂).

5.2 Aislamiento y cultivo primario de adipocitos.

Los adipocitos primarios se obtuvieron utilizando un método de digestión con colagenasa (47). En resumen, se extrajo el tejido adiposo del epidídimo de ratas anestesiadas y se lavó en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con albúmina (BSA) al 1%. El tejido adiposo se trituró con tijeras, se filtró y se añadió a HBSS con BSA al 10% y colagenasa al 0.2% (Tipo II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubó a 37°C durante 40 min. Posteriormente, la suspensión de células digeridas se filtró a través de una malla de 600 µm y se lavó con HBSS mediante centrifugación a 800 xg durante 10 min. El sedimento se eliminó y el

sobrenadante se lavó 3 veces con HBSS y una vez con DMEM / F12. Finalmente, se sembraron 200 µl de la fracción de adipocitos flotantes en placas de 12 pocillos en DMEM / F12 complementado con FBS al 10%.

5.3 Evaluación del destino metabólico de la leucina ó el palmitato:

Los adipocitos primarios se incubaron por 3 h con 0, 250, 500 y 1000 µM de palmitato y se evaluó la oxidación y la incorporación de lípidos o proteínas de 0.4µCi [U-¹⁴C]-leucina (actividad específica 1.98 Ci/mmol); o con 0, 250, 500 y 1000 µM de leucina y se evaluó la oxidación, la incorporación a lípidos o proteínas de [1-¹⁴C]-palmitato. Después del periodo de incubación, el medio se utilizó para evaluar la producción de ¹⁴CO₂, y las células se utilizaron para determinar la incorporación a lípidos o a proteínas.

5.3.1 Evaluación de la producción de ¹⁴CO₂.

Las células fueron incubadas por 3 horas con una mezcla conformada por las diferentes concentraciones de leucina/palmitato y su equivalente marcado con ¹⁴C. Después del periodo de incubación, la reacción de oxidación se detuvo y el CO₂ del medio se liberó con la adición de ácido sulfúrico 3M. Inmediatamente después de la adición del ácido sulfúrico se colocó sobre la superficie de la caja de Petri un papel filtro Whatman saturado con 2-feniletilamina para capturar el CO₂. Las cajas se sellaron completamente y se agitaron suavemente por 3 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el papel filtro se removió de cada

caja y se colocó en un vial de centello (Figura 17). El $^{14}\text{CO}_2$ resultado de la oxidación de la leucina/palmitato se cuantificó midiendo las cuentas de ^{14}C . Los ensayos se realizaron por triplicado, y los resultados se normalizaron al contenido total de proteína.

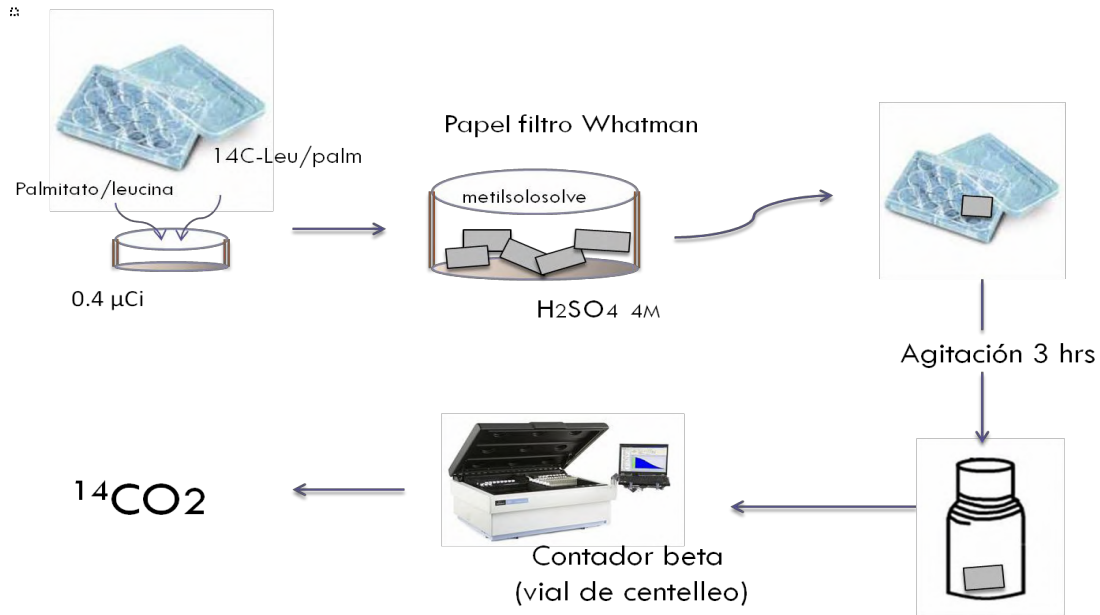


Figura 17. Diagrama evaluación de la producción de $^{14}\text{CO}_2$

5.3.2 Evaluación de la incorporación de ^{14}C a proteínas.

Las células se incubaron como en el inciso anterior. Después del periodo de incubación, se lavaron las células dos veces con PBS 1x, se les añadió $600 \mu\text{l}$ de SDS al 0.05% y se recolectaron en tubos eppendorf. Posteriormente se transfirieron $100 \mu\text{l}$ del lisado a filtros de papel Whatman. Se introdujeron los filtros en 250 ml de solución de TCA al 5%, se enjuagaron dos veces con TCA fresca, dos veces con acetona y finalmente con agua desionizada. Se pusieron a secar y una

vez secos, se colocaron en viales con líquido de centelleo y se cuantificaron en el contador beta (Figura 18).

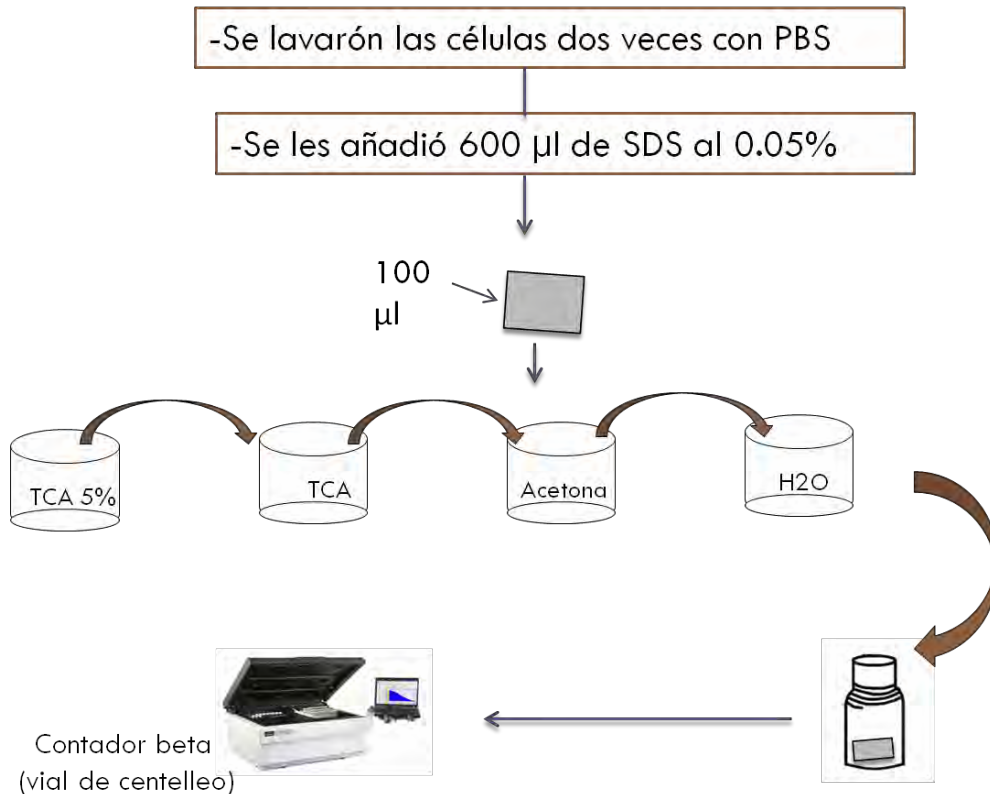


Figura 18. Diagrama incorporación a proteínas.

5.3.3 Evaluación de la incorporación de ^{14}C a lípidos.

Las células se incubaron como en el inciso anterior. Después del periodo de incubación, se lavaron dos veces con PBS 1x, se les añadió 600 µl de SDS al 0.05% y se recolectaron en tubos eppendorf. La fase lipídica se extrajo con una mezcla de cloroformo-metanol según la técnica de Folch y Bligh-Dyer (48). Brevemente, se agrega cloroformo-metanol (2:1) y se vortexea por 3 minutos,

después se le agrega NaCl_2 para separar las fases y se recupera la fase inferior con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. La capa clorofórmica obtenida se evaporó con N_2 y una vez evaporada se resuspendió en 150 μl de cloroformo-metanol. Finalmente, se agregaron 100 μl de la solución en vials con líquido de centelleo y se determinaron las cuentas de ^{14}C que corresponden a la formación de lípidos (Figura 19).

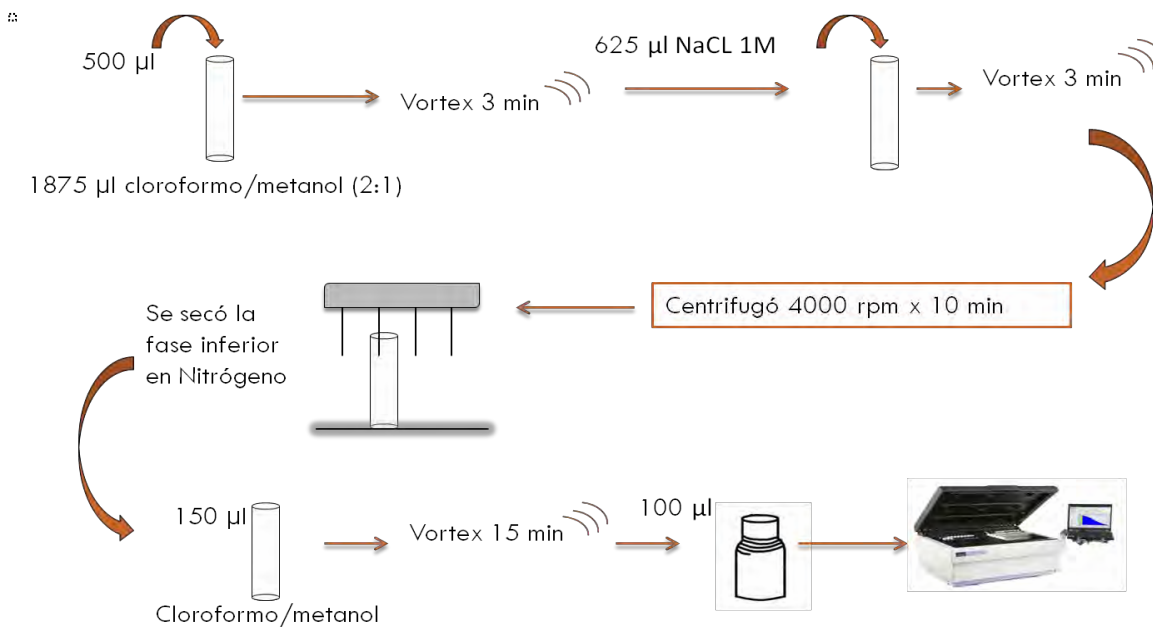


Figura 19. Diagrama incorporación a lípidos.

5.4 Determinación de expresión génica de BCAT2 y BCKDH.

Los ensayos mencionados anteriormente se realizaron sin la presencia del trazador radiactivo para obtener el RNA y las proteínas totales. Posteriormente, se midió la expresión de BCAT2 y BCKDH, el mRNA por medio de PCR en tiempo real y la proteína se midió por medio de Western-Blot.

5.4.1 Extracción de RNA total

El aislamiento de RNA total se realizó utilizando TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies). La muestra se colocó en tubo eppendor de 1.5mL, se adicionó 1 mL de Trizol y se homogenizó con ayuda de una perla de acero inoxidable en el equipo tissuelyser II (QIAGEN) a una frecuencia de 30 oscilaciones por segundo por 2 minutos. El tejido adiposo ya homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C para retirar el exceso de lípidos. Posteriormente, se añadió 200 µL de cloroformo, se homogenizó vigorosamente y se centrifugo a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C para separar la fase orgánica y la acuosa. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendor y se le adicionó isopropanol en relación 1:1 para precipitar el RNA. Se agito lentamente 5 veces, se dejó reposar 10 min, y se centrifugo a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 75% dando un vortex para despegar y centrifugando por 7 min a 14,000rpm 4°C. Finalmente, el sobrenadante se retiró y se dejó 60 min boca abajo para secar la pastilla. La pastilla se disolvió en 40 µL de H₂O DEPC estéril y se

incubaron en el termoblock a 65°C por 5 minutos seguida de una homogenización en vortex para asegurar su completa disolución.

5.4.2 Cuantificación RNA

Para cuantificar el ARN obtenido se utilizó un NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000). Brevemente, este aparato determina espectrofotométricamente la concentración de una muestra en base a su absorbancia a cierta longitud de onda. El RNA muestra un máximo pico de absorbancia a una longitud de onda a 260nm. Por lo tanto, se colocó 1.5 µL de cada muestra en el equipo el cuál determina la absorbancia a 260nm y calculando la concentración en base a que en esta longitud de onda una densidad óptica es igual a 40ug/ul. La pureza se determinó como buena cuando la relación de absorbancia 260 y 280 nm sea mayor a 1.8.

5.4.3 RT-PCR

Para determinar la concentración relativa del RNA mensajero de BCAT2 y BCKDH se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). La PCR-TR es una técnica comúnmente utilizada para generar múltiples copias de una secuencia de ADN en presencia de un agente (SYBR green) que emite fluorescencia al intercalarse con el DNA. Para la obtención de cDNA se realizaron diluciones del RNA total para alcanzar una concentración final de 1000 ng en un volumen de 9µL con H₂O Sigma estéril. Posteriormente, se preparó una mezcla de reacción conteniendo 4µL de buffer 5x (Tris-HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 4µL de dNTP's 2mM, 2µL

de DTT 0.1M, 2 μ L oligo dT (Invitrogen™), 0.5 μ L de enzima transcriptasa reversa MMLV y 0.5 μ L de inhibidor de Rnasa. Se tomaron los 13 μ L de esta mezcla de reacción y se ajustaron a 22 μ L con los 9 μ L de RNA. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). Finalmente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando sondas específicas para amplificar un fragmento de 200 pb de cada mensajero en el equipo Light Cycler 480 de Roche. Para determinar la dilución adecuada, se realizó un rango dinámico con cada tejido. Para ello se hicieron diluciones seriadas de nuestras muestras originales (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80). El siguiente paso fue preparar una mezcla de reacción que contenía 5 μ L de master mix (ROCHE), 2 μ L de H₂O sigma y 1 μ L de la sonda específica para cada gen. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se colocaron 8 μ L de la mezcla de reacción en cada pozo y después se agregaron 2 μ L de cada una de las diluciones seriadas. La placa se selló y se centrifugó por 5 min a 140000 rpm a 4°C, posteriormente se colocó la placa en el equipo LightCycler® 480 el cual lleva a cabo 55 ciclos a diferentes temperaturas. Una vez determinada la dilución adecuada, se preparó las diluciones de cada una de las muestras de cada uno de los tejidos y se llevó a cabo la reacción como fue descrito anteriormente. El análisis de los resultados se realizó tomando en cuenta los genes constitutivos ciclofilina y HPRT, la secuencia de los oligonucleotidos utilizados se encuentra en la Tabla 1.

	Forward	Reverse
BCAT2	CACGAATCATTTCAGGGGACAT	CGTGACGAATGAAAGCTTGG
BCKDH	GGTGAGCAAGGTAAGCAAAG	TCTGACCAAGGAAAGCAAAG
Ciclofilina	TAGGGACCAAGGAAAGCAAAG	TGTGACCAAGGAAAGCAAAG
HPRT	GACCAGTCAACAGGGGACAT	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG

Tabla 1: Secuencia de primers utilizados en el RT-PCR.

5.5 Western Blot:

Para la extracción de proteínas de los adipocitos primarios de las ratas, las células se lavaron con PBS 1X y luego se homogeneizaron con un buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 182 mM, EDTA 1 mM, Na₄P₂O₇ 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 50 mM NaF y 1% NP40) con inhibidor de proteasa (Complete, Roche). Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 min a 4°C, y la proteína total del sobrenadante se cuantificó mediante el método de Lowry (BioRad). Brevemente, se añadieron 5 µl de la muestra de proteína en una microplaca y posteriormente 25 µl del reactivo A' y finalmente se añadieron 200 µl del reactivo B. La mezcla de reacción se incubó por 45 minutos en un lugar oscuro y se leyó la placa en un espectrofotómetro (Chemidoc de BioRad) a una longitud de onda de 750 nm. Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida (PAGE) y posteriormente se transfirieron a membranas de fluoruro

de polivinilideno (PVDF) (Immobilon Transfer Membranes, Millipore). Las proteínas se detectaron utilizando el anticuerpo primario para BCAT2 (Santa Cruz, sc134964) y BCKDH (Santa Cruz, sc67200) y posteriormente un anticuerpo secundario anti-igG de Rabbit (Santa Cruz, sc2768). Las bandas se visualizaron usando un reactivo de quimioluminiscencia (reactivos de ECL Immobilon Western 199, Millipore 1:1). Se utilizó tubulina (sc7396, Santa Cruz) como control de carga. Las imágenes digitales de las membranas se obtuvieron por medio del ChemiDoc MP (Bio-Rad), y se procesaron con el software Image J 10 202. La densidad de banda de cada proteína se dividió por la densidad de banda de su control de carga.

5.6 Determinación de la abundancia relativa de miR29b.

Se realizó la extracción de RNA de tejido adiposo epididimal y músculo por medio del método de TRIZOL y se purificó el miRNA utilizando un kit de aislamiento de miRNAs (miRNeasy Mini Kit, Qiagen). Brevemente, el tejido se homogeniza con QIAzol, y posteriormente se le agrega cloroformo, el homogenado se separa en una fase acuosa y una orgánica por medio de centrifugación. El RNA se queda en la fase acuosa superior, el DNA en la interfase y las proteínas en la fase inferior. Se extrae la fase acuosa superior (RNA) y se le agrega etanol para proveer las condiciones adecuadas para la unión de todas las moléculas de RNA de 18 nt en adelante. Posteriormente la muestra se coloca en la columna (RNeasy mini spin column) que contiene una membrana de sílica, en la cual el RNA total se une y el

fenol y otros contaminantes se lavan. Finalmente el RNA se eluye en agua libre de RNasas. Posteriormente para evaluar la expresión de los microRNAs se utilizó el miScript PCR (Qiagen), que permite la detección de múltiples microRNAs a partir de un único cDNA. La síntesis de cDNA se realizó con el kit comercial miScript II RT (Qiagen), mediante el cual los microRNAs maduros son poliadenilados por una poli-A polimerasa y luego transcritos inversamente en cDNA usando cebadores oligo-dT. Para esto se usó el buffer 5X miScript HiSpec incluido en el kit, específico para preparar cDNA para la cuantificación subsecuente de microRNAs maduros. Se preparó el master mix: 4 μ L de 5X miScript HiSpec Buffer, 2 μ L de 10X miScript Nucleics Mix, 2 μ L de miScript Reverse Transcriptase Mix, RNA y volumen variable de agua, para un volumen final de reacción de 20 μ L. Se procedió a incubar a 37°C por 60 minutos, y luego se incubó a 95°C por 5 minutos para inactivar la miScript Reverse Transcriptase Mix. El cDNA fue almacenado a -20 °C hasta su utilización en los ensayos de RT-qPCR.

Finalmente la expresión de microRNAs se evaluó con el kit comercial miScript SYBR Green PCR (Qiagen), y con primers específicos previamente diseñados para el miR29b). Los niveles de expresión del miR29b fueron normalizados a los niveles de expresión del gen de referencia RNA nuclear pequeño RNU6.

5.7 Sobreexpresión e inhibición del miR29b en adipocitos mediante transfección.

Para evaluar el efecto del miR29b sobre la expresión de BCAT2 y BCKDH se utilizaron oligonucleotidos comerciales con la secuencia exacta del miR29b (mimic) para sobreexpresarlo y otro antisentido (inhibidor) para modular los niveles del miR29b endogeno. Para la transfección se utilizaron adipocitos primarios de ratas control, los cuales se extrajeron por el método de Rodbell descrito anteriormente y el protocolo de transfección fast-forward de Qiagen, en el que las células se siembran el mismo día de la transfección. Poco tiempo antes de la transfección, se sembraron 1.2×10^5 células por pozo en una placa de 12 pozos en 1100µl de medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de una mezcla de antibiotic y antimicótico. Las células se mantuvieron bajo condiciones de crecimiento normales (37°C y 5% CO₂). Posteriormente se diluyeron 75 ng del mimic de miR29b para sobreexpresar ó, en su caso, del oligonucleotide antisentido para inhibir el miR29b en 100 µl de medio de cultivo DMEM sin suero y se le agregó 6 µl de HiPerFect Transfection Reagent y se mezcló por medio de vortex. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir la formación de los complejos de la transfección. Una vez pasados los 10 minutos se les agregó a cada pozo la mezcla de los complejos gota a gota tratando de abarcar todo el pozo. Se mezclo girando suavemente la placa para asegurar la distribución uniforme de los complejos. Finalmente las células se incubaron bajo condiciones normales y se realice una curva de tiempo de 48 hrs para ver a las cuantas horas se observaba un incremento/disminución del miR29b. Se extrajó el RNA y posteriormente el miRNA como se describió anteriormente, y se analizó por medio

de PCR el nivel de expresión del miR29b. En la figura 20A se observa un aumento significativo del miR29b en comparación con el control a las 12h posteriores de la transfección. En la figura 20B se observa una disminución del miR29b en comparación con el control a las 24h de ser transfectado con el inhibidor. Por lo tanto, para los estudios posteriores se decidió utilizar la transfección a las 24 horas ya que se observa tanto la sobreexpresión como la inhibición del miR29b dependiendo del oligonucleotide transfectado. Posteriormente se extrajo tanto RNA como proteína para evaluar su efecto por medio de PCR y Western Blot descrito anteriormente.

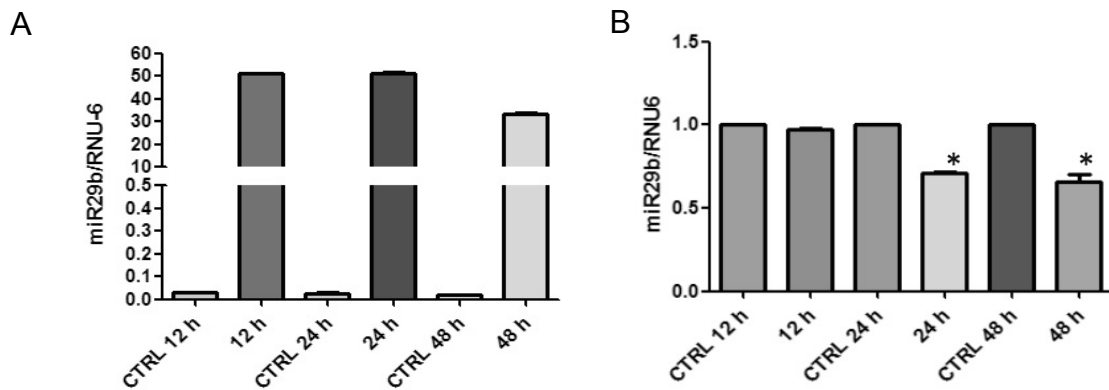


Figura 20. Expresión génica del miR29b en adipocitos de ratas controles transfectados con el A) mimic de miR29b y B) inhibidor a las 12, 24 y 48 horas. Prueba--t(**P<0.001)

5.8 Desarrollo del plásmido PGL3-control con la region 3'UTR de la BCAT2.

Para la amplificación y clonación de la region 3'UTR de BCAT2, se diseñaron primers con sitios de restricción para XbaI. Para el diseño de los primers primero se verificó por medio de microRNA.org que el miR29b se une a la porción 3UTR de la BCAT2 y posteriormente se diseñaron los diferentes primers (Tabla 2) utilizando el programa Primer3 Input (version 4.0) y se verificaron en OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator). Una vez que se obtuvieron los primers se realizó un PCR de gradiente para verificar la temperatura adecuada para obtener un producto específico. A la par se realizó la digestión del PGL3-Control y del producto con la enzima de restricción XbaI. Posteriormente, se purificaron tanto el vector digerido como el product de PCR y se ligaron a 4°C overnight (12 horas). El vector ligado se transformó en células competentes XL1-Blue por medio de electroporación. Estas se sembraron en cajas de medio agar suplementado con ampicilina y se dejaron en la incubadora por 12 horas a 37°C. Al día siguiente se verificó que hubiera crecimiento de colonias y se picaron las colonias bien definidas y aisladas (no colonias satelites) y se reincubaron en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina por 12 horas a 37°C. Al día siguiente se verificó el crecimiento de bacterias y se realizó aislamiento de DNA del plásmido por medio del Plasmid DNA Miniprep Kit de Thermo Fisher. Una vez obtenida la construcción del 3'UTR de BCAT2, se secuencio el plasmido para comprobar que efectivamente teníamos el fragmento deseado insertado en la posición correcta.

Para esto se realizó un PCR con el kit de genome lab DTCS- quick start kit-, se purificó el producto de PCR y se secuenció en el equipo Beckman Coulter ceq 8800. Posteriormente se analizaron los datos con el programa Ceq System y se realizó un blast entre la secuencia obtenida de la secuenciación y la esperada utilizando el programa de Blastn de NCBI, en la página: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Figura 21)

3-UTR BCAT2	F: GCTCTAGAGCGAAAGGTCGTTCCAGACTGC R: GCTCTAGAGCCCTGAGAACGGAGATCGAGA
-------------	--

Tabla 2: Secuencias de primers utilizados para evaluar la union del miR29b a la porción 3UTR de la BCAT2..

Download		Graphics	
Sequence ID: Query_70733 Length: 162 Number of Matches: 1			
Range 1: 1 to 162		Graphics	
		Next Match Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps
293 bits(324)	1e-84	162/162(100%)	0/162(0%)
Strand	Plus/Plus		
Query 1	TGGCTCTCTGGCACCCCTCACGTGGAAGTTACACTCCAAAGCCTTAAGGGCGGGACCCATG	60	
Sbjct 1	TGGCTCTCTGGCACCCCTCACGTGGAAGTTACACTCCAAAGCCTTAAGGGCGGGACCCATG	60	
Query 61	TAATTTGGACCCACCTCAGTTCAGCTGCTCCGCGTCCTGGTGTTC AAGAGAGAACCTTG	120	
Sbjct 61	TAATTTGGACCCACCTCAGTTCAGCTGCTCCGCGTCCTGGTGTTC AAGAGAGAACCTTG	120	
Query 121	GCTCTCTCTCGATCTCCGTTCTCAGGCCGGATCCCCGGTGCT	162	
Sbjct 121	GCTCTCTCTCGATCTCCGTTCTCAGGCCGGATCCCCGGTGCT	162	

Figura 21: Blast de la secuencia obtenida y la esperada del plásmido UTR-BCAT2.

5.9 Ensayos de luciferasa.

Para determinar si el miR29b se une a la región 3'UTR de BCAT2 se realizaron ensayos de luciferasa en células HEK293. Para ello, se transfectó el vector vacío (PGL3control) o el plásmido con la región 3'UTR de la BCAT2, con el mimic o el inhibidor del miR29b en las células HEK293 utilizando lipofectamina 2000 (Life Technologies) por 24 horas de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, un día antes de la transfección se sembraron las células HEK293 en placas de 24 pozos en condiciones normales (37°C y 5% CO₂). Al día siguiente se verificó que las células tuvieran una confluencia entre el 70-90% y se diluyó la lipofectamina en medio Opti-MEM sin suero y los complejos a transfectar. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregó el complejo de transfección a cada uno de los pozos. Después de las 24 horas, se procedió a medir la cantidad de luciferasa utilizando el kit dual luciferase kit de Promega. Brevemente, las células se lavaron con PBS 1x, se lisaron utilizando el passive buffer 1x, se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente 20 µL del sobrenadante se colocaron en cada pozo de una placa de 96 y se procedió a medir la cantidad de luciferasa presente en la muestra. Se añadieron 50 µL del tampón LAR II sobre cada muestra y luego otros 50 µL del tampón Stop&Glo, y determinó la luciferasa en el luminómetro de Veritas.

5.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media de cada grupo. Para cada parámetro determinado, las diferencias entre los grupos se evaluaron por medio de una t de students para comparar dos grupos o por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba post-test de Bonferroni para comparar más de dos grupos usando el programa estadístico Graphpad Prism 5. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Desarrollo del modelo animal con obesidad inducida con dieta, resistencia a la insulina e inflexibilidad metabólica.

Las ratas Sprague Dawley se dividieron en dos grupos de 6 cada uno (grupo control, y grupo HFD). El grupo control recibió una dieta basada en la AIN-93, que contiene un 10% en grasa, y el grupo HFD recibió una dieta alta en grasa que contenía 45% de Kcal de grasa en forma de manteca. El primer día (designado como día 0) se pesó a las ratas y se verificó que no hubiera diferencias significativas en cuanto a su peso entre los grupos (control = 83.1 ± 5.51 g, y HFD = 86.0 ± 6.68 g). Posteriormente, se pesaron cada 2 días durante 5 meses. Al final del estudio, el grupo control presentó un peso de 426.4 ± 10.79 g y el peso del grupo HFD fue significativamente mayor con 495.6 ± 20.82 g (Tabla 1). Adicionalmente, para verificar el desarrollo de resistencia a la insulina en el modelo se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. En la tabla 1 podemos observar que las ratas del grupo HFD tienen un área bajo la curva mayor que las del grupo control indicando el desarrollo de intolerancia a la glucosa. Para evaluar el efecto de la HFD en la composición corporal, se determinó el porcentaje de masa magra y masa grasa por medio de resonancia magnética. El grupo HFD presentó un mayor porcentaje de masa grasa y un menor porcentaje de masa magra que el grupo control (Tabla 1). Para evaluar el efecto de la HFD sobre los parámetros bioquímicos se determinó la concentración

en plasma de glucosa, insulina, colesterol, colesterol LDL, HDL, triglicéridos, y de relevancia para este proyecto la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina. Interesantemente, el grupo HFD presentó una mayor concentración de colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, y leucina, isoleucina y valina que el grupo control (Tabla 3). Estos resultados indican que la HFD genera una alteración en la concentración plasmática de los AACR probablemente debido a una alteración en su metabolismo.

	Controles n=4	DAG n=6
Peso (g)	426.4 ± 10.7	495.6 ± 20.8**
Glucosa (mg/dl)	215.8 ± 31.4	201.5 ± 32.2
AUC	15703.5 ± 2472.2	19390.8 ± 1405.6*
Colesterol (mg/dl)	99.4 ± 13.2	133.7 ± 10.3**
Colesterol LDL (mg/dl)	19.6 ± 4.9	33.5 ± 6.4*
Triglicéridos (mg/dl)	115.4 ± 12.6	195.4 ± 44.1*
Colesterol HDL (mg/dl)	68.9 ± 7.3	71.4 ± 5.7
Masa grasa	13.4 ± 1.80	22.4 ± 1.45**
Masa magra	78.2 ± 1.68	71.03 ± 1.94*
Valina (µM)	236.4 ± 13.6	274.7 ± 27.2*
Leucina (µM)	155.7 ± 7.1	177.9 ± 22.4*
Isoleucina (µM)	104.9 ± 4.7	121.1 ± 15.2*

Tabla 3. Parámetros antropométricos y bioquímicos del modelo animal. Grupo control y grupo HFD. AUC: es el área bajo la curva de una prueba de tolerancia ia a la glucosa. Los datos se analizaron con una prueba T-Student. (* P<0.05,**P<0.001).

Recientemente, se ha descrito que el consumo de las dietas altas en grasa con llevan al desarrollo de inflexibilidad metabólica. La flexibilidad metabólica es la capacidad de cambiar la oxidación de sustratos conforme a la disponibilidad o el estado metabólico (ayuno, postprandio). Una persona de peso normal durante el postprandio oxida principalmente hidratos de carbono ya que la glucosa se encuentra disponible, y durante el ayuno oxida principalmente lípidos debido a la falta de glucosa. Sin embargo, se ha demostrado que en los sujetos obesos este “switch” o cambio de oxidación de metabolitos entre el ayuno y postprandio no se da, ya que aún en postprandio siguen oxidando lípidos. A este fenómeno se le conoce como “inflexibilidad metabólica” (49).

Para evaluar la inflexibilidad metabólica en nuestro modelo animal, se realizó una calorimetría indirecta a los grupos de estudio. En la figura 22C y 22D se observa que durante el día (periodo de ayuno) tanto el grupo control como el grupo HFD presentan un coeficiente respiratorio cercano a 0.8 indicando que las ratas están oxidando principalmente lípidos. Sin embargo, en el periodo de la noche (recuadros grises), que es el periodo en el que las ratas comen (postprandio), el grupo control aumentan su CR cerca de 1, lo que indica que están oxidando principalmente hidratos de carbono. Sin embargo, el CR del grupo HFD sigue alrededor de 0.8, lo cual indica que las ratas siguen oxidando lípidos a pesar de tener glucosa disponible, sugiriendo la presencia de inflexibilidad metabólica.

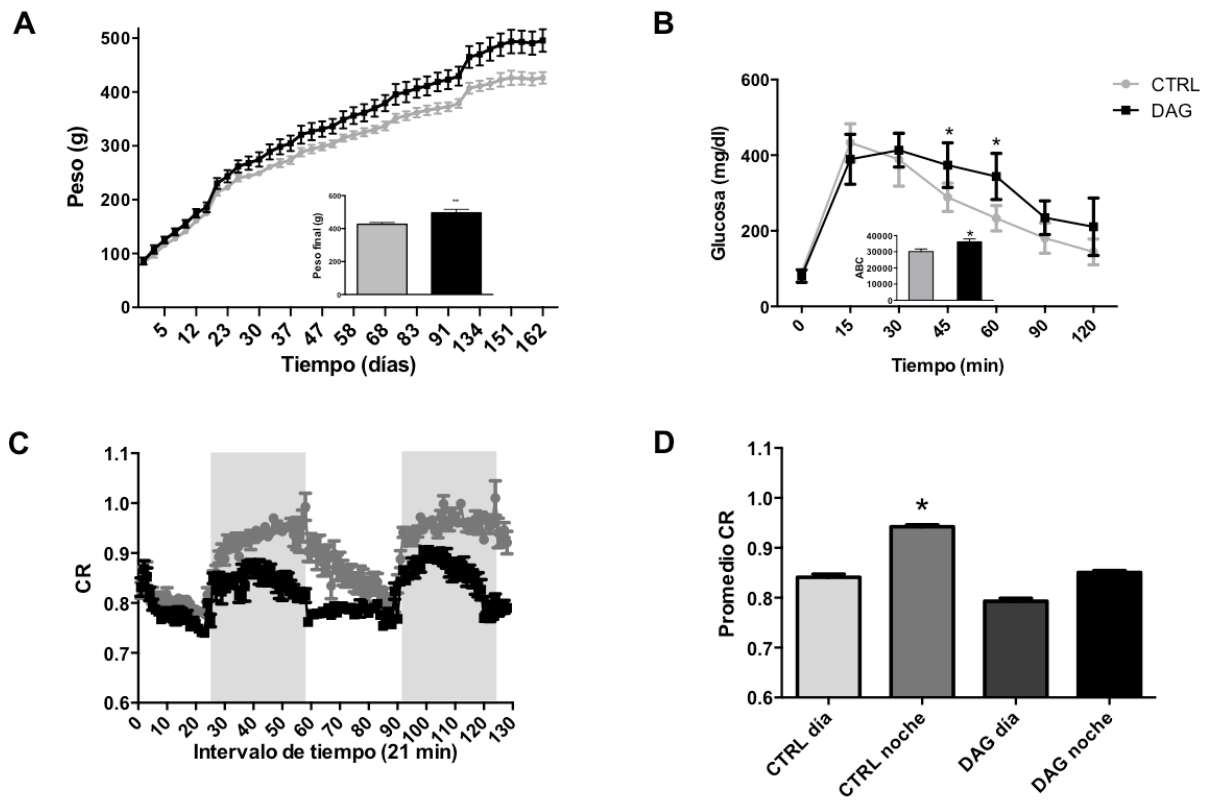


Figura 22. A) Ganancia peso corporal, B) curva de tolerancia a la glucosa, C,D) coeficiente respiratorio (CR) del grupo control y el grupo DAG. Las ratas se dejaron 24 horas en el calorímetro con un periodo de ayuno de 8 horas y con libre acceso al alimento (recuadros grises). (* $P < 0.005$).

En conjunto, estos resultados confirman que las ratas del grupo HFD presentan alteraciones en los parámetros antropométricos y bioquímicos asociados con la obesidad, intolerancia a la glucosa, así como inflexibilidad metabólica, e interesantemente un incremento en las concentraciones de los aminoácidos de cadena ramificada; por lo tanto, es un excelente modelo para evaluar las alteraciones que se dan en el adipocito con respecto al metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada durante la obesidad.

6.2 Evaluación del destino metabólico de la leucina y palmitato en adipocitos.

6.2.1 Efecto del palmitato sobre el destino metabólico de la leucina en adipocitos de ratas control o alimentadas con una dieta alta en grasa.

El destino metabólico de la leucina dentro del adipocito presenta tres alternativas: la oxidación hasta CO_2 y H_2O , la incorporación a lípidos o la incorporación a proteínas. Para determinar el efecto del palmitato en la oxidación de leucina, los adipocitos se incubaron con $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -leucina en presencia de diferentes concentraciones de palmitato (0, 250, 500 y 1000 μM) y se cuantificó el $^{14}\text{CO}_2$ producido en el transcurso de tres horas para determinar la cantidad de leucina oxidada y el ^{14}C en la fracción lipídica y de proteínas. En la figura 23 se puede observar que en condiciones basales la leucina es principalmente incorporada a la fracción lipídica, después utilizada en la síntesis de proteínas y en menor proporción oxidada. Interesantemente, las concentraciones crecientes de palmitato no modificaron la incorporación de la leucina a la fracción lipídica. Sin

embargo, concentraciones crecientes de palmitato disminuyeron la incorporación de la leucina a la síntesis de proteínas y aumentaron la oxidación de la leucina (Figura 23A).

Posteriormente evaluamos el destino metabólico de la leucina en adipocitos de ratas con una HFD. En la figura 23B se puede observar que, al igual que en el adipocito de ratas control, en condiciones basales, la leucina en adipocitos de ratas con dieta alta en grasa es principalmente incorporada a la fracción lipídica, después utilizada en la síntesis de proteínas y en menor proporción oxidada. De manera interesante, la presencia de palmitato no modifica la oxidación de la leucina a una concentración de 250 μM y 500 μM , sin embargo a una concentración de 1000 μM aumentó significativamente la oxidación de la leucina. Por otro lado, concentraciones crecientes de palmitato disminuyeron la incorporación de leucina a las fracciones tanto proteica como lipídica.

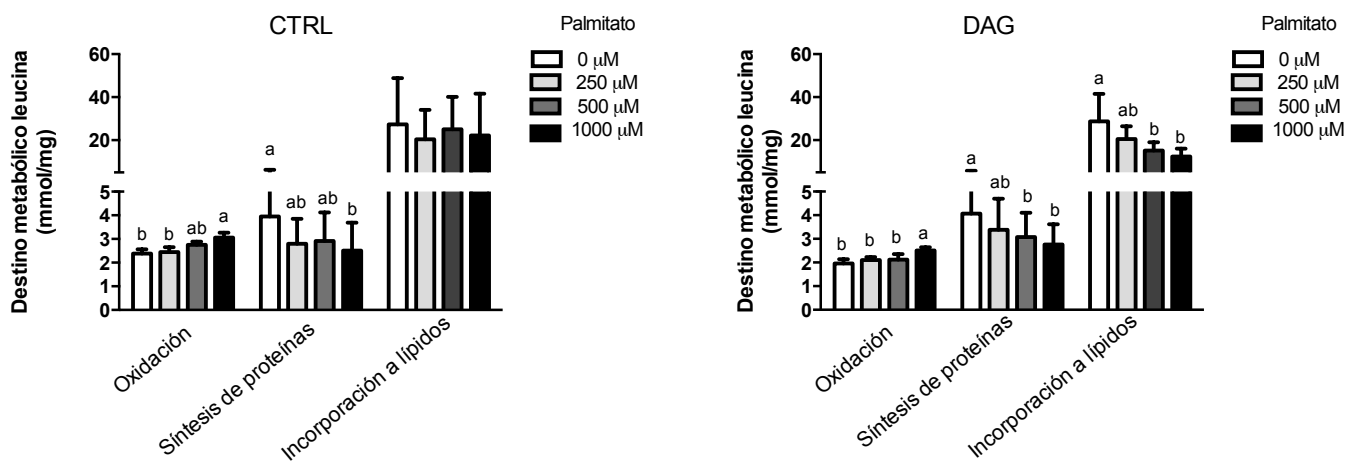


Figura 23: Destino metabólico de [U-¹⁴C]-leucina en adipocitos de ratas control (A) y ratas con HFD (B) Los adipocitos fueron incubados con 200 μM de leucina en presencia de las concentraciones indicadas de palmitato (0, 250, 500, 1000 μM). Los valores representan el promedio ± error estándar, n= 3. Las letras indican diferencia significativa entre grupos (P<0.05) a>b>c obtenidas mediante ANOVA de una vía.

En conjunto estos resultados nos indican que en los adipocitos la leucina es principalmente utilizada en la síntesis de lípidos y que en adipocitos de una rata con una dieta alta en grasa este almacenamiento se ve afectado por concentraciones crecientes de palmitato. Dentro del metabolismo de la leucina se produce acetil-CoA el cual puede ser utilizado en la síntesis de lípidos por la acetil coA carboxilasa (ACC). Es posible que la presencia de palmitato inhiba esta enzima por inhibición de producto. Por otro lado, la leucina sin metabolizar puede participar en la síntesis de proteínas proceso que también se ve alterado por el palmitato, es posible que altas concentraciones de palmitato inhiban la síntesis de proteínas al inducir estrés del retículo endoplásmico. Por otro lado, contrario a lo que esperado, el palmitato incrementa la oxidación de la leucina, es posible que el palmitato afecte directamente la expresión de la BCAT2 y la BCKDH o que

produzca algún metabolito que afecte directamente su actividad. Por lo tanto, es necesario evaluar estas hipótesis lo cuál se muestra más adelante.

6.2.2 Efecto de la leucina sobre el destino metabólico del palmitato en adipocitos de rata control y con dieta alta en grasa.

El destino metabólico del palmitato dentro de la célula incluye: 1) su oxidación hasta CO_2 y H_2O ; 2) su almacenamiento en forma de triglicéridos; y 3) su unión covalente a residuos de cisteína o treonina de las proteínas celulares proceso conocido como palmitoilación de proteínas. Para determinar como la presencia de leucina modifica el destino metabólico del palmitato en los adipocitos, se midió la oxidación, la incorporación a lípidos y proteínas del $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitato. Para ello, los adipocitos se incubaron con diferentes concentraciones de leucina (0, 250, 500 y 1000 μM) en presencia de $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitato y se cuantificó el $^{14}\text{CO}_2$ producido para determinar el nivel de oxidación. De igual manera se cuantificó la cantidad de ^{14}C en las fracciones lipídicas y de proteínas para evaluar la cantidad de palmitato utilizado en la formación de lípidos y en la palmitoilación de proteínas.

En la figura 24A se puede observar que en condiciones basales el palmitato es principalmente incorporado a la síntesis de lípidos, después utilizado en la síntesis de proteínas y en menor proporción oxidado. Interesantemente, las concentraciones crecientes de leucina disminuyeron la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir del palmitato con respecto al control indicando una menor oxidación del

palmitato. En cuanto al efecto de la leucina sobre la palmitoilación de proteínas, en la figura 24 se puede observar que no hubo cambios entre las diferentes concentraciones. Estos resultados nos indican que la leucina no afecta la incorporación del palmitato a la fracción de proteínas a las concentraciones utilizadas. Finalmente, en cuanto a la incorporación de lípidos, la leucina incremento la incorporación de palmitato a la fracción de lípidos especialmente a una concentración de 500 μM .

Posteriormente, evaluamos el efecto de la leucina sobre el destino metabólico del palmitato en adipocitos de ratas con una dieta alta en grasa. En la figura 24B se puede observar que al igual que en los adipocitos de ratas control, en condiciones basales en adipocitos de ratas con dieta alta en grasa, el palmitato es principalmente incorporado a la fracción lipídica, después utilizada en la síntesis de proteínas y en menor proporción oxidado. Interesantemente, concentraciones crecientes de leucina disminuyeron significativamente la oxidación de palmitato y la incorporación del palmitato a la fracción de proteínas. Sin embargo, las concentraciones crecientes de leucina no modificaron la cantidad de palmitato que es incorporada a la fracción lipídica de los adipocitos.

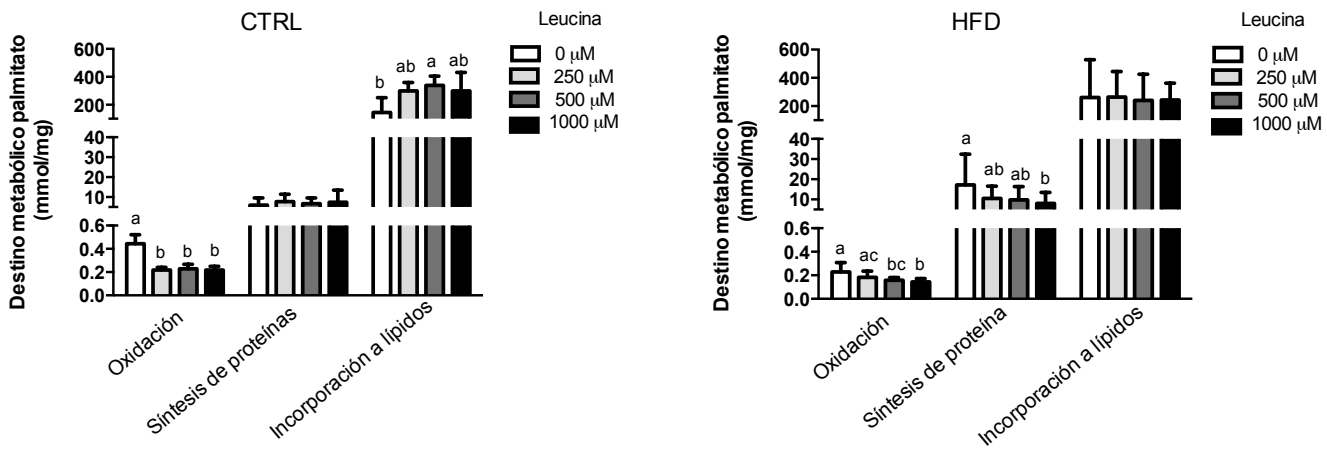


Figura 24: Destino metabólico del [1-¹⁴C]-palmitato en adipocitos de ratas control (A) y ratas con HFD.(B). Los adipocitos fueron incubados con 200mM de leucina en presencia de las concentraciones indicadas de palmitato (0, 250, 500, 1000 μM). Los valores representan el promedio ± error estándar, n= 3. Las letras indican diferencia significativa entre grupos (P<0.05) a>b>c obtenidas mediante ANOVA de una vía.

En conjunto, los resultados muestran que la leucina disminuye la oxidación de palmitato en ambos grupos; sin embargo en el grupo de dieta alta en grasa este efecto se ve atenuado, ya que la disminución de la oxidación de palmitato es menor. Esta disminución podría ser propia de las características de un adipocito hipertrófico por la dieta alta en grasa de manera crónica, ya que como se observa de manera basal la oxidación de palmitato es menor en el adipocito de las ratas HFD, en comparación con el adipocito de ratas controles. En cuanto a la palmitoilación de proteínas, en el grupo control no se encontraron cambios significativos; mientras que en el grupo de dieta alta en grasa la palmitoilación de

proteínas disminuye con una concentración de $1000\mu\text{M}$. La disminución en la palmitoilación de proteínas podría tener efectos importantes ya que se ha visto que la palmitoilación de las proteínas al hacerlas más hidrosolubles puede participar en diversos procesos como interacciones proteína-proteína y tráfico subcelular. En cuanto a la síntesis de lípidos en el grupo control se encontró un aumento, el cual no se da en el grupo de dieta alta en grasa. Estos resultados nos indican que un adipocito en condiciones normales almacena la leucina en forma de lípidos, sin embargo un adipocito de una rata que recibió de manera crónica una dieta alta en grasa ya no es capaz de almacenar el exceso de leucina en forma de lípidos.

6.3. Efecto del palmitato sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en adipocitos primarios de ratas control

Para determinar si los cambios en el destino metabólico de la leucina por el palmitato están asociados con cambios en la expresión génica de las enzimas BCAT2 y la BCKHD por un efecto a corto plazo, se decidió evaluar la abundancia relativa del mRNA de ambas enzimas. Los adipocitos primarios se incubaron por 3 h con 0, 250 y 500 y $100\mu\text{M}$ de leucina (esta vez sin el trazador radioactivo) en presencia y ausencia de $250\mu\text{M}$ de palmitato y se hizo extracción de RNA. En la figura 25 se puede observar que la abundancia relativa del mRNA de la BCAT2 y de la BCKDH no se modifica por las concentraciones crecientes de leucina, ni al incubar en presencia de palmitato. Estos resultados nos indican que los cambios observados en los adipocitos de las ratas control y obesas no se deben a

cambios en la expresión de las enzimas durante la incubación, si no que puede ser un efecto por la cantidad de sustrato, a mayor cantidad de sustrato mayor oxidación e incorporación a proteínas y lípidos ó por alteraciones en la expresión génica generadas a largo plazo por el consumo de la dieta alta en grasa.

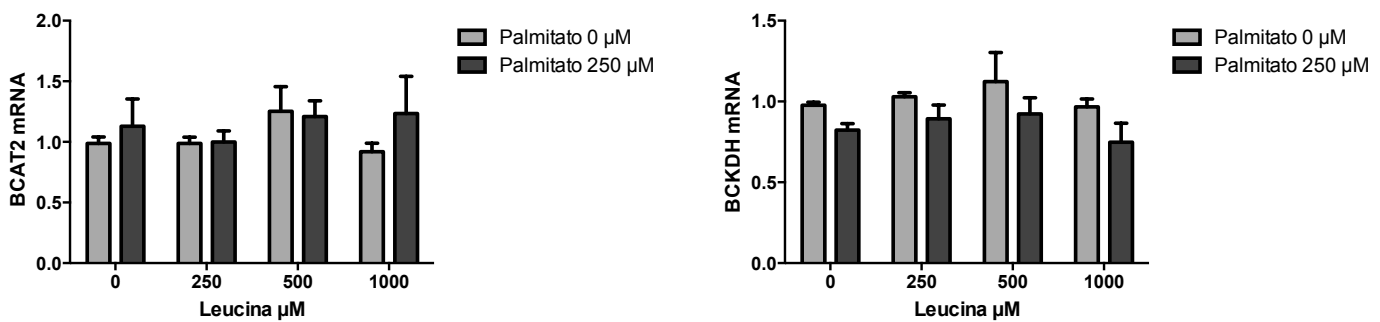


Figura 25: Expresión génica de BCAT2 y de BCKDH de adipocitos de ratas control que fueron incubados con 250 μM de palmitato en presencia de las concentraciones indicadas de leucina (0, 250, 500, 1000 μM). Los valores representan el promedio ± error estándar, n= 3. Las letras indican diferencia significativa entre grupos (P<0.05) a>b>c obtenidas mediante ANOVA de una vía.

6.4 .Efecto de la dieta alta en grasa sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas.

Debido a que el palmitato no modificó la expresión génica de las enzimas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, principalmente la BCAT2 y la BCKDH a corto plazo, se decidió evaluar el efecto del consumo de una dieta alta en grasa a largo plazo sobre la expresión génica de la BCAT2 y BCKDH en tejidos de ratas controles y ratas con HFD. Para ello, se obtuvo el RNA de hígado, riñón, músculo, tejido adiposo epididimal, perirenal, subcutáneo y pardo, y mediante PCR en tiempo real se midió la cantidad de RNAm de la BCAT2 y BCKDH. En la figura 26 se puede observar que la BCAT2 se expresa principalmente en riñón, músculo y tejido adiposo y muy poco en el hígado. Por el contrario la BCKDH se expresa principalmente en riñón e hígado y músculo, y en menor cantidad en tejido adiposo.

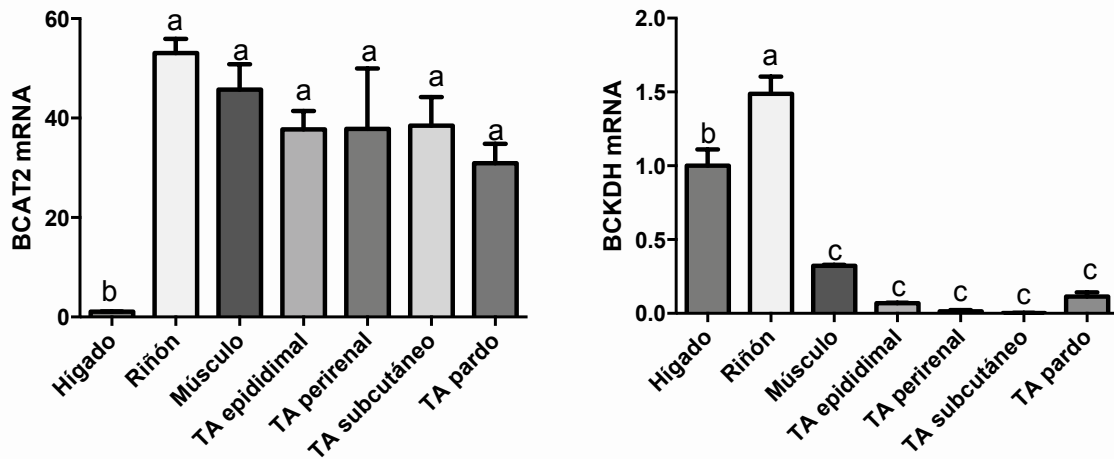


Figura 26: Expresión génica de la BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=3$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$) $a > b > c$ obtenidas mediante ANOVA de una vía.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la dieta alta en grasa sobre la cantidad de RNAm de la BCAT2 y la BCKDH en los tejidos en que mayor se expresan cada una de las enzimas. En la figura 26 se puede observar que la dieta alta en grasa no modificó la expresión de la BCAT2 y BCKDH en el tejido adiposo epididimal y pardo. Interesantemente, la dieta alta en grasa presentaron una disminución significativa en la expresión de ambas enzimas en el tejido adiposo subcutáneo con respecto al grupo control. En la figura 27, se puede observar que no hubo diferencia significativa en el hígado, músculo y riñón entre el grupo control y el grupo HFD.

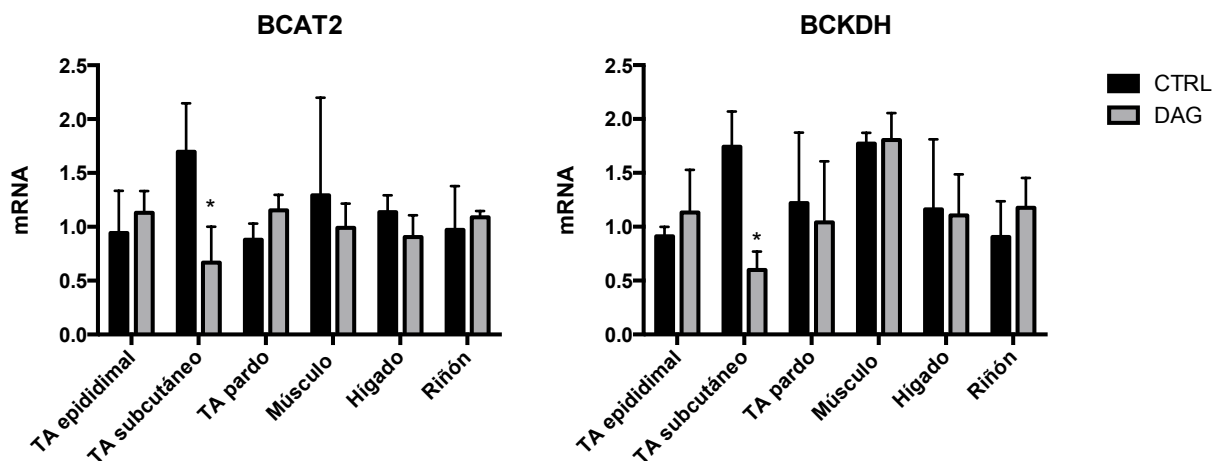


Figura 27: Expresión génica de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos. Prueba-t (*P<0.05).

En conjunto los resultados obtenidos sugieren que la disminución de las enzimas BCAT2 y BCKDH en el tejido adiposo subcutáneo podría ser el responsable de la elevación en plasma de los aminoácidos de cadena ramificada en el grupo de las ratas con dieta alta en grasa. De igual manera, los resultados indican que la disminución de BCAT2 y BCKDH es cepa dependiente ya que en otras cepas como las ratas Zucker se ve una disminución clara en estas enzimas en modelos de obesidad.

6.5 Efecto del palmitato y la leucina sobre las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, gliceroneogénesis y estrés del retículo endoplásmico

Para evaluar si los cambios en el destino metabólico del palmitato o la leucina modifican la abundancia de enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos y la gliceroneogénesis, incubamos adipocitos primarios con palmitato o leucina (0, 250, 500 o 1000 μM) durante 3 horas y posteriormente evaluamos la abundancia de acil coenzima A oxidasa (ACOX1), acetil coenzima carboxilasa (ACC), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) mediante western blot (Figura 28). Curiosamente, el aumento de la concentración de palmitato incrementó la abundancia de las proteínas de ACOX1, PEPCK y HMGCR y la fosforilación de ACC, lo que sugiere que las altas concentraciones de palmitato aumentan la β -oxidación, la gluconeogénesis y la síntesis de colesterol. Por otro lado, el aumentar la concentración de leucina, incrementó la abundancia de PEPCK, HMGCR y la fosforilación de la ACC, y disminuyó la abundancia de la proteína de ACOX1, lo que sugiere que las altas concentraciones de leucina pueden disminuir la β -oxidación y aumentar la síntesis de colesterol explicando la disminución en la oxidación del palmitato con concentraciones crecientes de leucina. En general, estos resultados demuestran que el palmitato y la leucina modifican la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos y la gliceroneogénesis.

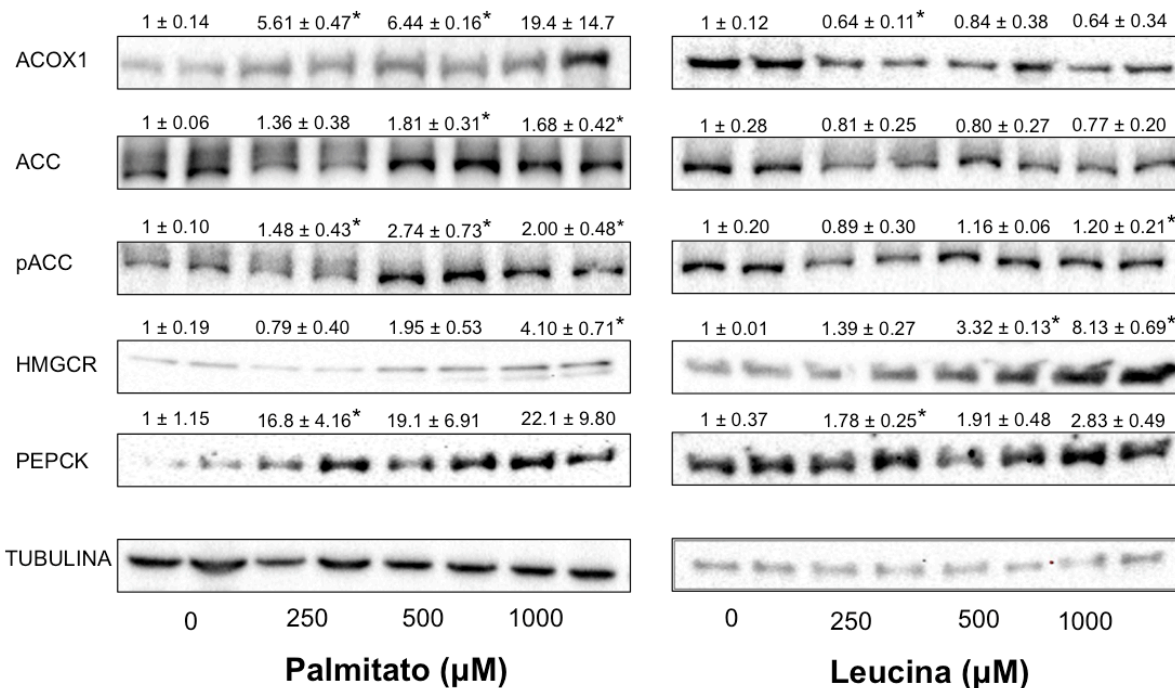


Figura 28: Cantidad de proteína de ACOX1, ACC, pACC, HMGR y PEPCK. Determinada por medio de Western Blot en proteína obtenida de adipocitos de ratas alimentadas con una dieta control e incubados con 0, 250, 500 o 1000 μM de palmitato y leucina. La tubulina se utilizó como control de carga. Prueba-t (* $P < 0.05$).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que altas concentraciones de palmitato causan estrés en el retículo endoplásmico, lo que desencadena la activación de la respuesta de la proteína desplegada (UPR). Dos de las principales acciones de la UPR son la supresión de la síntesis de proteínas y el empalme del ARNm de XBP1 que produce la isoforma de XBP1s (50). Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de palmitato y leucina en la inducción de estrés del retículo endoplásmico, incubamos adipocitos primarios con palmitato o leucina 0, 250, 500 o 1000 μM durante 3 h y medimos XBP1 y XBP1s por Western Blot (Figura 29). Al aumentar la concentración de palmitato aumentó la expresión de

XBP1s, lo que indica la activación de UPR. Sin embargo, aumentar la concentración de leucina no tuvo un efecto significativo en la abundancia de XBP1 o XBP1s (Figura 29). En general, estos resultados indican que altas concentraciones de palmitato, pero no de leucina, inducen estrés en el retículo endoplásmico de los adipocitos lo que puede explicar la disminución en la síntesis de proteína observada con las concentraciones crecientes del palmitato.

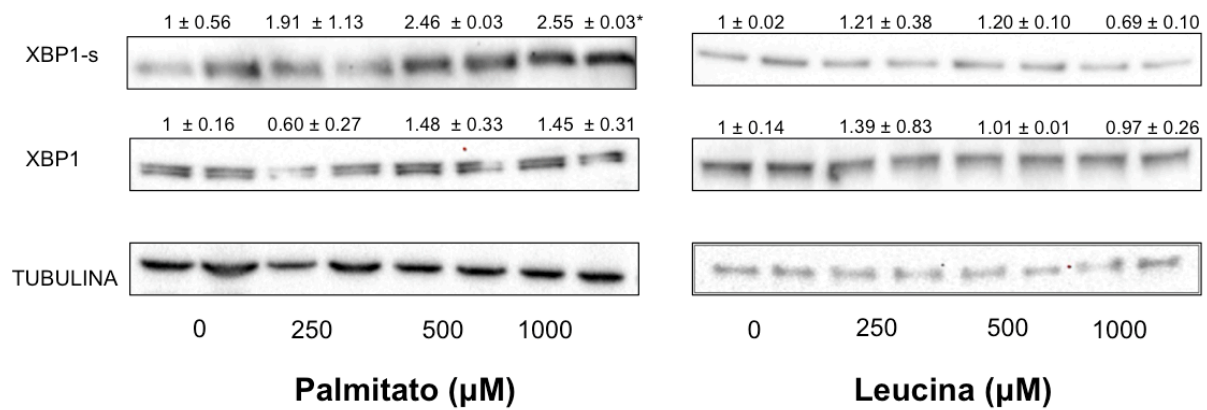


Figura 29: Cantidad de proteína de XBP1 y XBP1s. Determinada por medio de Western Blot en proteína obtenida de adipocitos de ratas alimentadas con una dieta control e incubados con 0, 250, 500 y 1000 µM de palmitato y leucina. La tubulina se utilizó como control de carga. Prueba-t (*P<0.05).

6.6 Efecto del envejecimiento sobre el destino metabólico de la leucina en adipocitos de ratas.

Por otro lado, durante el envejecimiento se presentan diversos cambios metabólicos que son similares a algunos de los cambios metabólicos observados durante la obesidad como son incremento de la glucosa e insulina en plasma, incremento de los ácidos grasos libres, disminución de la masa magra y aumento de la masa grasa (51). Sin embargo, se desconoce si el envejecimiento modifica el metabolismo de los AACR. Para determinar si el destino metabólico de la leucina se modifica por el envejecimiento, se evaluó el efecto de la edad sobre el destino metabólico de la leucina. Para ello, se incubaron adipocitos primarios de ratas wistar jóvenes (3 meses) y ratas wistar viejas (14 meses) con [U-¹⁴C]-leucina y se midió la producción de CO₂, así como las cantidad de ¹⁴C en la fracción lipídica y de proteínas. De manera interesante, en la figura 30 se puede observar que el grupo de las ratas viejas presentan una menor oxidación de leucina, así como una menor incorporación tanto a la fracción lipídica como a la de proteínas indicando que el metabolismo de la leucina se ve reducido con la edad.

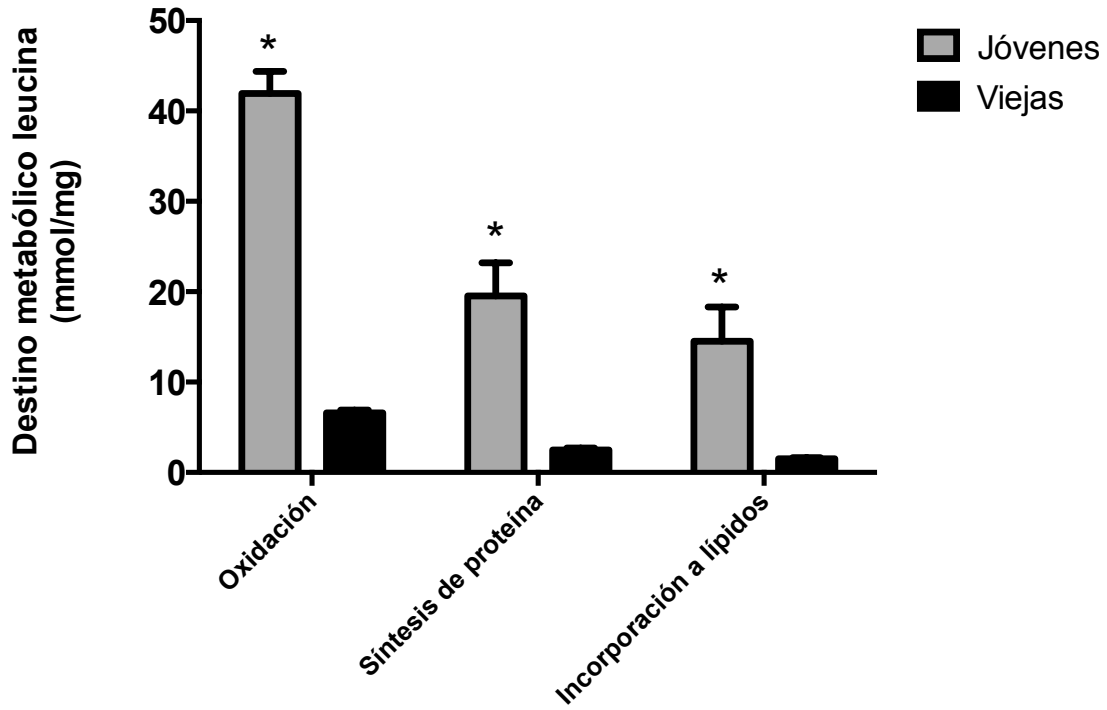


Figura 30: Destino de la [U-¹⁴C]-leucina en adipocitos de ratas jóvenes y viejas. Los adipocitos se incubaron durante 3 h con leucina. Prueba-t (*P<0.05).

6.7 Efecto del envejecimiento sobre la expresión génica de la BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas.

Para evaluar si la disminución en la utilización de la leucina en los adipocitos de ratas viejas está asociada con cambios en la cantidad de mRNA y proteínas de las enzimas BCAT2 y BCKDH, se extrajo el ARN y proteínas de hígado, riñón, músculo, tejido adiposo epididimal, perirenal, subcutáneo y se determinó su expresión. En la figura 31 se puede observar que la cantidad de ARNm de la BCAT2 y BCKDH no se modificó en el tejido adiposo subcutáneo, perirenal y pardo entre el grupo de ratas viejas y el grupo de ratas jóvenes. Sin embargo, la expresión de BCAT2 y BCKDH disminuyó significativamente en el tejido adiposo epididimal de las ratas viejas en comparación a las ratas jóvenes.

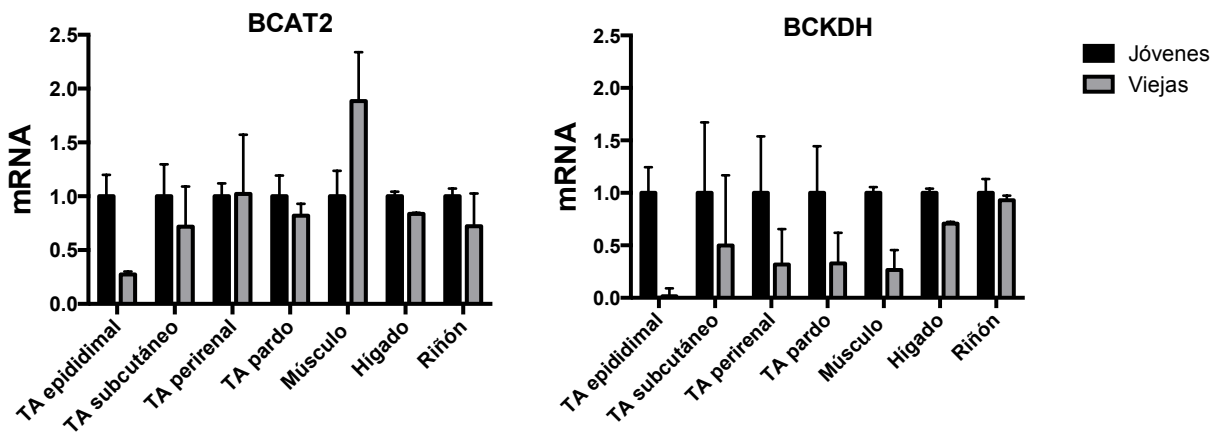


Figura 31: Expresión génica de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas jóvenes y viejas. Prueba-t (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$).

En cuanto al hígado se puede observar que hay una disminución de ambas enzimas (BCAT2 y BCKDH) en el grupo de las ratas viejas en comparación del grupo de ratas jóvenes. Debido a que la cantidad de BCAT2 que hay en hígado es muy poca, puede ser que esta disminución no afecte tanto el metabolismo de los AACR, sin embargo la disminución observada de la BCKDH en hígado si es importante, ya que esta enzima se expresa en grandes cantidades en este tejido. En el riñón no se encontraron diferencias significativas entre las ratas viejas con respecto al grupo ratas jóvenes (Figura 31). Interesantemente, en el músculo la cantidad de ARNm de la BCAT2 en las ratas viejas aumentó significativamente en comparación al grupo de ratas jóvenes, y por el contrario, la cantidad de ARNm de la BCKDH disminuye en las ratas viejas en comparación de las ratas jóvenes. El aumento de BCAT2 en músculo, se ha observado en previos estudios realizados en el laboratorio en un modelo de obesidad inducida por dieta con ratones C57BL/6, esta elevación podría ser resultado de un mecanismo compensatorio e indica una regulación tejido especifica de estas enzimas.

En conjunto, estos resultados muestran que existe una disminución de BCAT2 en el tejido adiposo epididimal y de BCKDH en el hígado y músculo durante el envejecimiento, lo cual podría explicar el incremento en el plasma de estos aminoácidos durante el envejecimiento.

6.8. Cantidad de proteína de BCAT2 y BCKDH en diferentes tejidos de ratas control y ratas viejas.

Para determinar si los cambios observados en el mensajero de BCAT2 y de la BCKDH se ven reflejados en la proteína, se extrajo la proteína de tejido adiposo epididimal, de músculo y de hígado y se realizaron los Western Blots correspondientes para medir BCAT2 y BCKDH.

En la figura 32 se puede observar que la cantidad de proteína de BCAT2 y la BCKDH disminuyó significativamente en el tejido adiposo epididimal de las ratas viejas con respecto a las ratas controles, lo cual concuerda con la disminución del mRNA antes visto. En cuanto al hígado, se puede observar que existe una tendencia a disminuir en el grupo de las ratas viejas en comparación con el control, sin embargo esta disminución no es significativa. Y finalmente, en cuanto al músculo, observamos el mismo patrón que con el ARNm, en el cual la BCKDH disminuye de manera significativa en el grupo de las ratas viejas en comparación con las ratas control. En cuanto a la BCAT2 al igual que en la cantidad de mensajero se ve un aumento en el grupo de las ratas viejas, sin embargo este aumento no fue significativo en comparación con el grupo control.

Los resultados obtenidos demuestran que durante el envejecimiento existe una disminución de BCAT2 en el tejido adiposo epididimal y de BCKDH en hígado y músculo que puede alterar los niveles plasmáticos de los AACR.

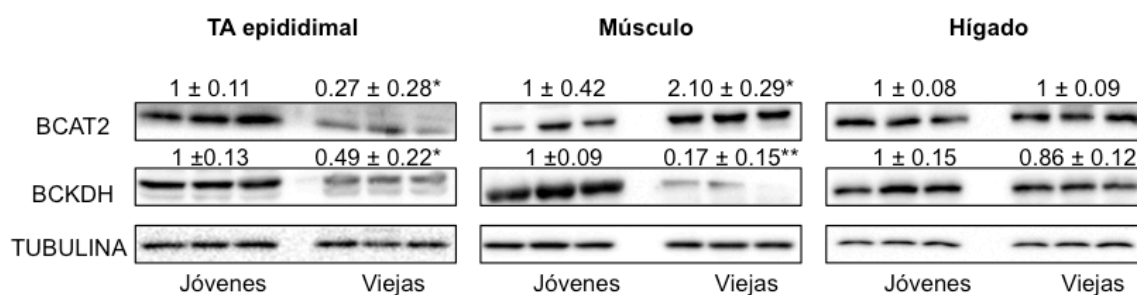


Figura 32: Cantidad de proteína de BCAT2 y BCKDH en tejido adiposo epididimal de ratas jóvenes y viejas. Prueba-t(*P<0.05).

6.9. Regulación de la BCAT2 y BCKDH por acción de miRNAs.

Dentro de los mecanismos que pueden modificar la cantidad de mRNA y proteína de una enzima en específico se encuentran los microRNAs. Los microRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes que regulan varias vías metabólicas y que están implicados en diferentes patologías. En general estos regulan los niveles de sus genes blanco a nivel postranscripcional, principalmente uniéndose a la región 3' UTR. Realizando una búsqueda en la literatura encontramos dos trabajos que apoyan la hipótesis de que la disminución de BCAT2 y BCKDH es mediada por un microRNA. El primero fue publicado en el 2013 por Esslinger et al donde observaron que el miR-277 en la mosca *Drosophila melanogaster* regula a la baja la expresión de estas enzimas y reprime el complejo de la BCKDH (52). El segundo trabajo fue realizado en humanos y encontraron que el miR29b es el que regula el BCKDH (46). El miR29b está conservado tanto en humanos como en rata y ratón. Adicionalmente, se realizó un análisis bioinformático para

identificar si BCAT2 y BCKDH son genes potencialmente blanco del miR29. Los programas que se utilizaron fueron: TargetScan, disponible en: www.targetscan.org, PICTAR (www.pictar.org), MicroRNA (www.microRNA.org) y PITA (www.genie.weizmann.ac.il).

El análisis bioinformático demostró e identificó el posible alineamiento entre el miR29b y las enzimas BCAT2 y BCKDH. En la figura 33 se muestra el alineamiento entre la BCAT2 y el miR29b y el mirSVR score que arroja el programa microRNA.org. Para que un gen sea considerado blanco potencial de un miRNA, el mirSVR score debe ser ≤ -1.2 .

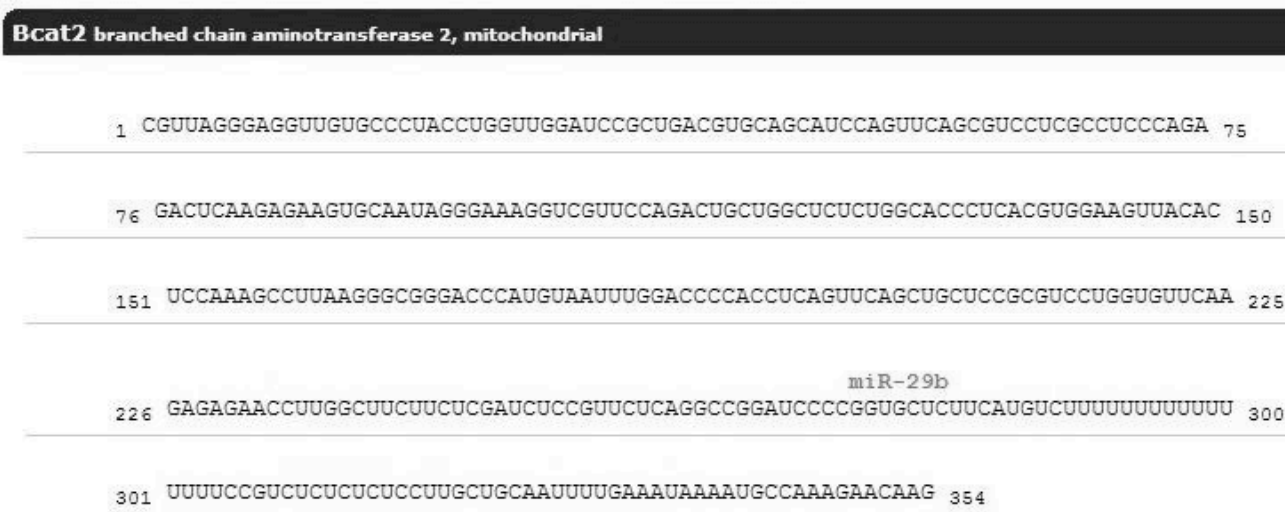


Figura 33: Alineamiento entre el rno-mir-29b y la mBCAT2. Obtenido de MicroRNA.org.

6.10. Efecto del envejecimiento sobre la expresión génica de miR29b en diferentes tejidos de ratas jóvenes y viejas.

Teniendo en cuenta que el miRNA29 tienen un posible sitio de alineamiento en BCAT2 y BCKDH, se determinó la expresión del miR29b en los diferentes tejidos de las ratas jóvenes y viejas para calcular la asociación entre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH y la del miR29b. En la figura 34 se puede observar que hay un aumento significativo en la expresión de miR29b en el tejido adiposo epididimal, músculo y hígado de las ratas viejas en comparación con las ratas jóvenes.

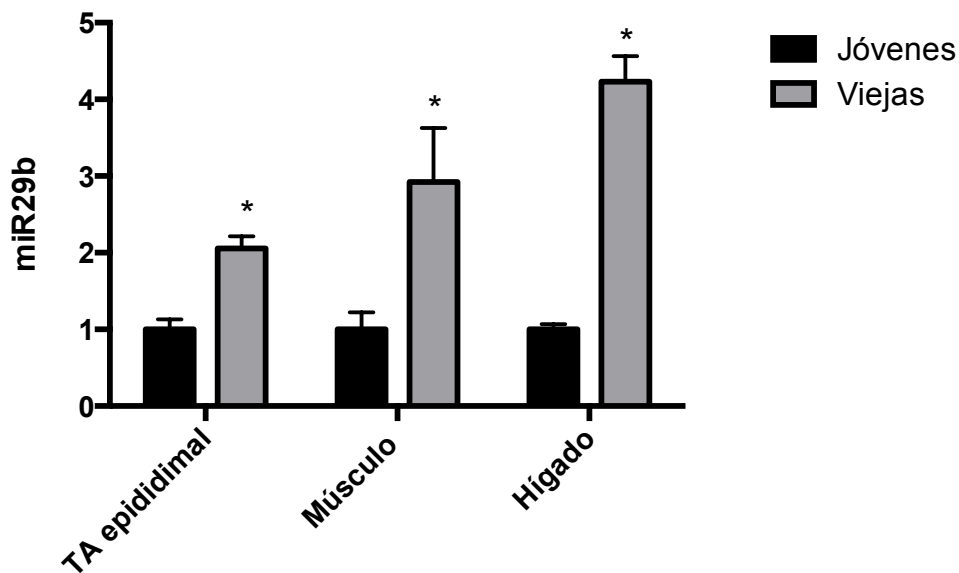


Figura 34: Expresión génica del miR29b en: T.A epididimal, hígado y músculo de ratas jóvenes y viejas. Prueba-t (*P<0.05)..

De manera interesante, como podemos ver en la figura 35 existe una correlación negativa entre el miR29b y la BCAT2 y BCKDH, ya que mayor cantidad de miR29b menor cantidad de BCAT2 y BCKDH.

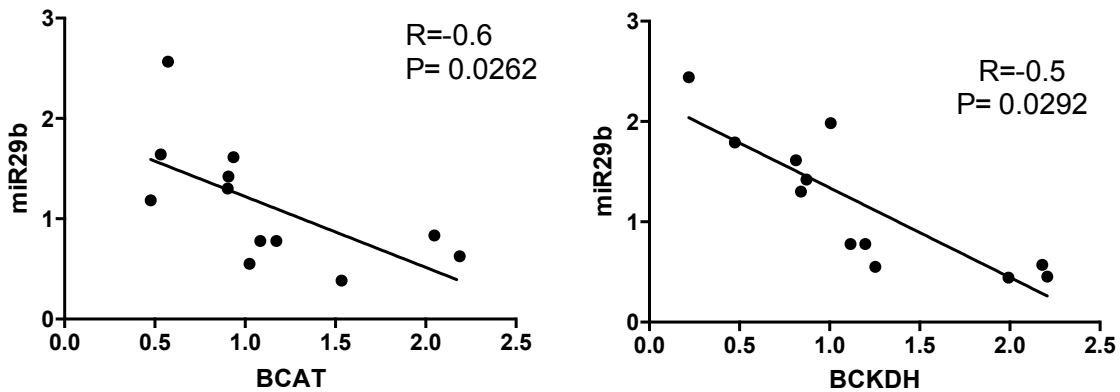


Figura 35: Correlaciones entre la BCAT2 y BCKDH con el miR29b en ratas jóvenes y viejas.

La mayor expresión del miR29b tanto en tejido adiposo epididimal, como en músculo y en hígado de las ratas viejas podría explicar la disminución de las enzimas BCAT2 y BCKDH y sugiere que durante el envejecimiento el miR29b altera el catabolismo de los AACR. Para demostrar que el miR29b es responsable de la regulación a la baja de la BCAT2 y la BCKDH se realizaron ensayos sobreexpresando o inhibiendo el miR29b en adipocitos de ratas jóvenes.

6.11. Efecto de la sobreexpresión e inhibición del miR29b sobre la expresión génica de BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles.

Para determinar si el miR29b regula a la baja la expresión de las enzimas BCAT2 y BCKDH se evaluó el mRNA y la proteína de BCAT2 y BCKDH en adipocitos primarios que sobreexpresan al miR29b. En la figura 36 se puede observar que la abundancia relativa del RNAm de la BCAT2 y de la BCKDH disminuye de manera significativa cuando se sobreexpresa el miR29b.

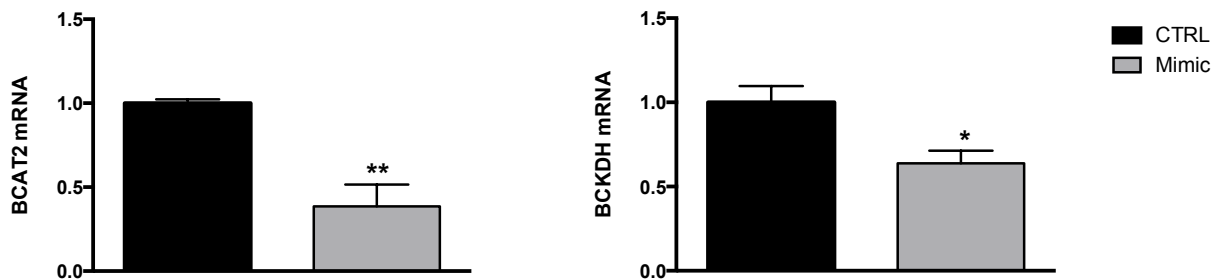


Figura 36: Expresión génica de BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles transfectados con el mimic de miR29b por 24 horas. Prueba---t(*P<0.05, **P<0.001).

Por otro lado, en la figura 37 se puede observar que la cantidad de proteína de la BCAT2 disminuye de manera significativa cuando se sobreexpresa el miR29b en comparación con los controles. En cuanto a la BCKDH no hubo diferencia estadísticamente significativa, sin embargo se ve una clara tendencia a disminuir estando en presencia del mimic del miR29.

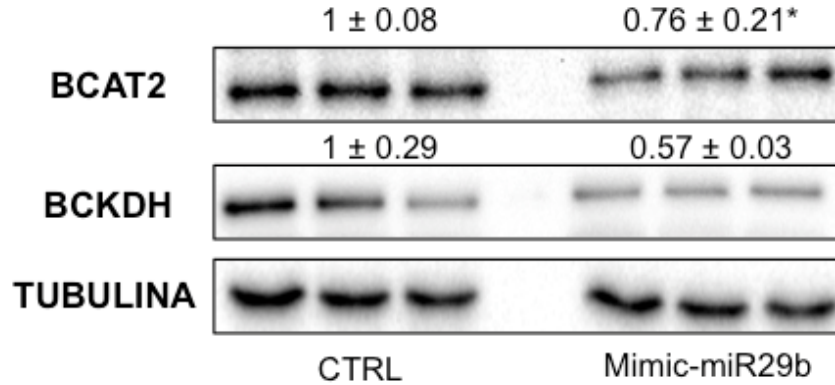


Figura 37: Cantidad de proteína de la BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles transfectados con el mimic de miR29b por 24 horas. Prueba-t(*P<0.05).

6.12. Inhibición del miR29b en adipocitos de ratas controles

Por otro lado, se evaluó si una disminución del miR29b tiene un impacto sobre la expresión de BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas transfectados con el inhibidor del miR29b. En la figura 38 se puede observar que la cantidad de la BCAT2 y la BCKDH no se modifica en adipocitos transfectados con el inhibidor del miR29b, aunque en la BCKDH parece verse una ligera tendencia a aumentar.

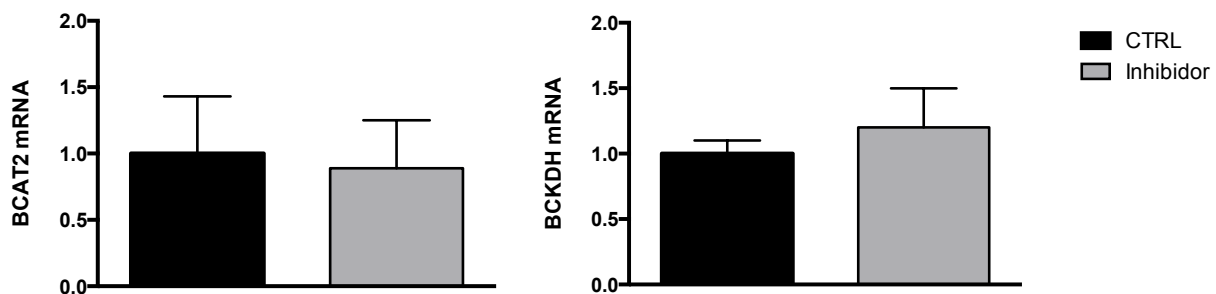


Figura 38: Expresión génica de la BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles transfectados con el inhibidor de miR29b por 24 horas.

En cuanto a la cantidad de proteína, en la figura 39 se puede observar que la BCAT2 aumenta de manera significativa en adipocitos transfectados con el inhibidor del miR29b en comparación con los controles. En cuanto a la BCKDH no hubo diferencia estadísticamente significativa, sin embargo se ve una clara tendencia a aumentar estando en presencia del inhibidor del miR29b.

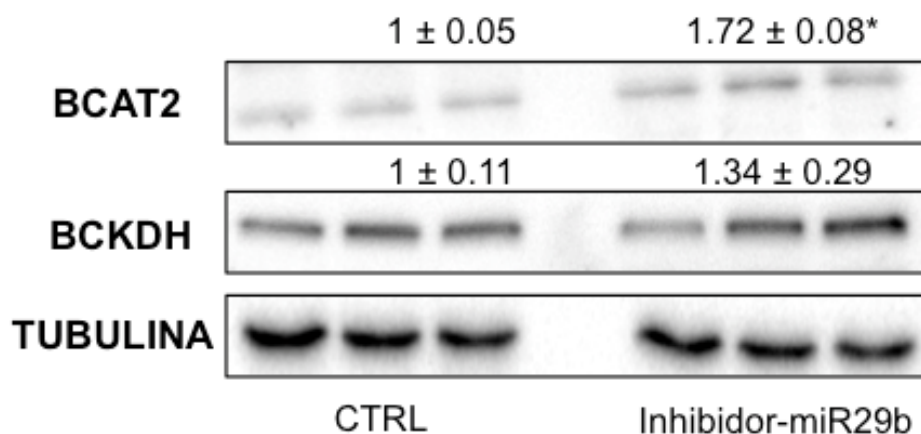


Figura 39: Cantidad de proteína de la BCAT2 y BCKDH en adipocitos de ratas controles transfectados con el inhibidor de miR29b por 24 horas Prueba-t (*P<0.05).

6.13. Evaluación de la unión del miR29b a la porción 3' UTR de la BCAT2

Para evaluar que el miR29b se une a la porción 3'UTR de la BCAT2, se realizaron ensayos de luciferasa utilizando el plasmido PGL3-control con la region 3'UTR de la BCAT2 (PGL3-3'UTR BCAT2). En la figura 40, se puede observar una disminución de la actividad de la luciferasa cuando se transfecta el plasmido

PGL3-3'UTR BCAT2 en comparación con el vector vacío (PGL3-control). De manera interesante, el mimic disminuyó significativamente la actividad del plasmido PGL3-3'UTR BCAT2 pero no la del PGL3-control. Por otro lado, el inhibidor del miR29b no modificó la actividad de luciferasa del plasmido PGL3-3'UTR BCAT2. Estos resultados nos indican que el miR29b se une de manera específica a la región 3'UTR de la BCAT2, y por lo tanto, regula la expresión de esta enzima.

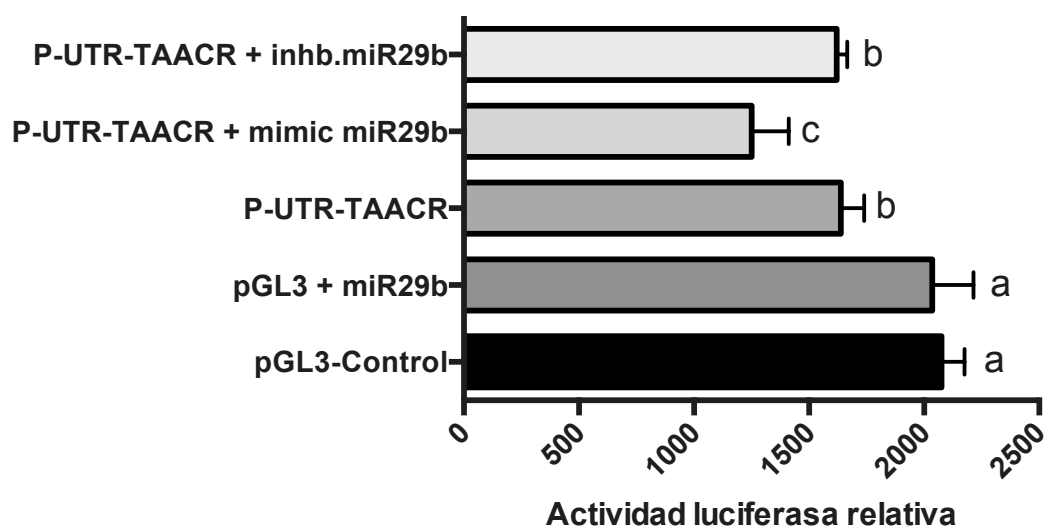


Figura 40: Actividad de la luciferasa UTR-BCAT2 y mimic/inhibidor miR29b. ANOVA de una vía. (a>b>c a una p<0.05)..

6.14 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico de la leucina y el palmitato en adipocitos de ratas.

6.14.1 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico de la leucina en presencia de palmitato en adipocitos de ratas.

Debido a que durante la obesidad disminuye la cantidad de proteína de la BCAT2 y la BCKDH alterando el metabolismo de los AACR y que nuestros resultados sugieren que esta disminución se atribuye a la presencia del miR29b, evaluamos si la sobreexpresión del miR29b modifica el destino metabólico de la leucina y el palmitato adipocitos. Para ello, se realizaron los ensayos de ^{14}C en adipocitos transfectados con el mimic del miR29b y se evaluó el destino metabólico de la leucina en presencia de palmitato y viceversa.

En la figura 41A se puede observar que la oxidación de leucina disminuye en los adipocitos que sobreexpresan el miR29b en comparación con los adipocitos control. Esto es de esperarse ya que el mimic del miR29b está disminuyendo la cantidad de proteína de la BCAT2 y de la BCKDH, por lo que la oxidación de leucina se ve disminuída. Sin embargo, el palmitato no modifico el destino metabólico de la leucina. En cuanto a la incorporación a la fracción proteíca y la fracción lipídica, en la figura 41 B y C se puede observar que no existe diferencia entre los adipocitos control y los adipocitos incubados con el mimic del miR29b.

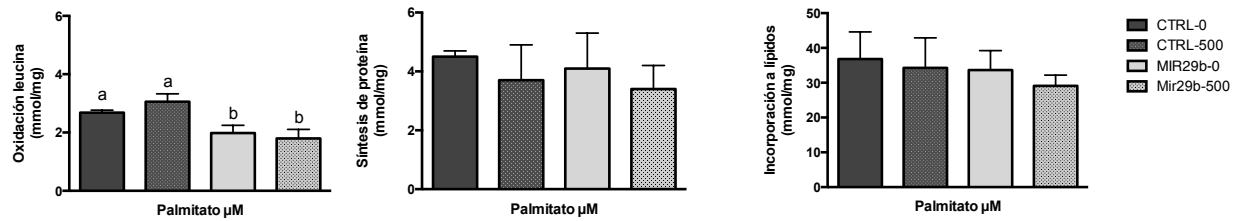


Figura 41. A) Oxidación de [U-¹⁴C]-leucina en adipocitos de ratas control transfectados con el mimico del miR29b. B) Síntesis de proteína de [U-¹⁴C]-leucina, C) Incorporación a lípidos de [U-¹⁴C]-leucina. Los adipocitos fueron incubados con 200 μM de leucina en presencia de 500 μM de palmitato. ANOVA de una vía. (a>b a una p<0.05).

6.14.2 Efecto del miR29b sobre el destino metabólico del palmitato en presencia de leucina en adipocitos de rata.

En cuanto al efecto del miR29b sobre la oxidación del palmitato en presencia de leucina, en la figura 42 A se puede observar que la presencia de 500 μM de leucina disminuyó la oxidación del palmitato tanto en los adipocitos controles como en los adipocitos que sobreexpresan el miR29b. Estos resultados van de acuerdo con lo que se había observado anteriormente en los ensayos de ¹⁴C en los que, de igual manera, se ve una disminución de la oxidación de palmitato en presencia de altas concentraciones de leucina. Estos resultados sugieren que los efectos de la leucina sobre el destino metabólico del palmitato son ocasionados por la presencia de altas concentraciones de leucina, y no del fenotipo o de la disminución de la BCAT2 y la BCKDH.

En cuanto a la palmitoilación de proteínas, en la figura 42 B se puede observar que la incorporación del palmitato a la fracción proteica disminuye en los adipocitos que sobreexpresan el miR29b, mientras que la presencia de 500 μM de leucina no

modificó la incorporación del palmitato en ninguno de los dos grupos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de ^{14}C previos, ya que la palmitoilación de proteínas no se modificaba con la presencia de leucina en el grupo de los adipocitos de ratas controles. Sin embargo, en los adipocitos de ratas obesas se observaba una disminución de la palmitoilación de las proteínas. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia del miR29b y por consiguiente la disminución de la BCAT2 y BCKDH afectan la incorporación del palmitato a la fracción proteica.

Finalmente, en cuanto a la incorporación a lípidos, se puede observar que la presencia de 500 μM de leucina incrementa la incorporación a lípidos del palmitato en los adipocitos control. Sin embargo, esto no sucede en el grupo de los adipocitos que sobreexpresan el miR29b, donde disminuyó la incorporación a lípidos del palmitato independientemente de la presencia de leucina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de los ensayos de ^{14}C en los adipocitos de ratas controles y adipocitos de ratas con obesidad inducida por dieta, ya que en el grupo control aumenta la incorporación a lípidos del palmitato con altas concentraciones de leucina, efecto atenuado en los adipocitos de ratas obesas. En conjunto, los resultados sugieren que la presencia del miR29b y por consiguiente la disminución de la BCAT2 y BCKDH disminuyen el almacenamiento de lípidos durante la obesidad debido a un defecto en el metabolismo de los AACR.

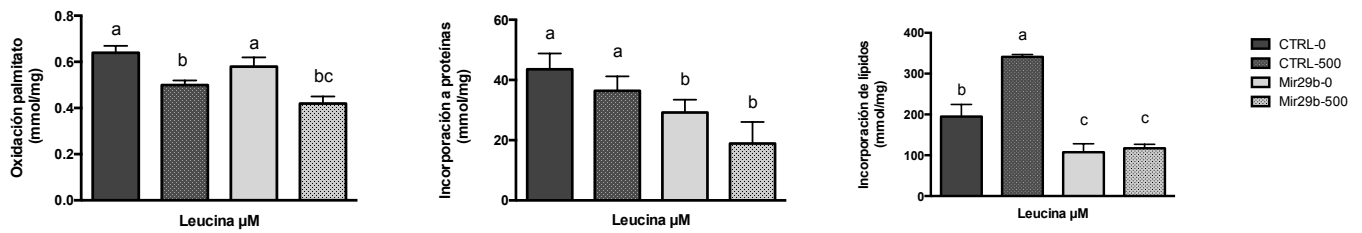


Figura 42. A)Oxidación de [1-¹⁴C]-palmitato en adipocitos de ratas control transfectados con el mimic del miR29b. B) Incorporación de proteína [1-¹⁴C]-palmitato, C) Incorporación de lípidos [1-¹⁴C]-palmitato. Los adipocitos fueron incubados con 200mM de palmitato en presencia de 500 μM de leucina . ANOVA de una vía. (a>b>c a una p<0.05).

6.15. Efecto del envejecimiento sobre la cantidad de proteína y estado de fosforilación de Akt y S6k en tejido adiposo de ratas.

Para evaluar el efecto del envejecimiento sobre la cascada de señalización de insulina se determinó la cantidad de proteína y el estado de fosforilación de Akt y S6k en el tejido adiposo. En la figura 43, se puede observar que la fosforilación de S6k en el tejido adiposo. En la figura 43, se puede observar que la fosforilación de S6K disminuye de manera significativa en el tejido adiposo de ratas viejas en comparación con los controles. En cuanto a la fosforilación de Akt, no hubo diferencia significativa, sin embargo se puede observar una tendencia a la baja en el tejido adiposo de las ratas viejas. Estos resultados indican el desarrollo de resistencia a la insulina durante el envejecimiento. Sin embargo, es necesario establecer los mecanismos asociados con el desarrollo de resistencia a la insulina durante el envejecimiento los cuales puede estar relacionado al aumento del miR29b y a las alteraciones en el metabolismo de los AACR.

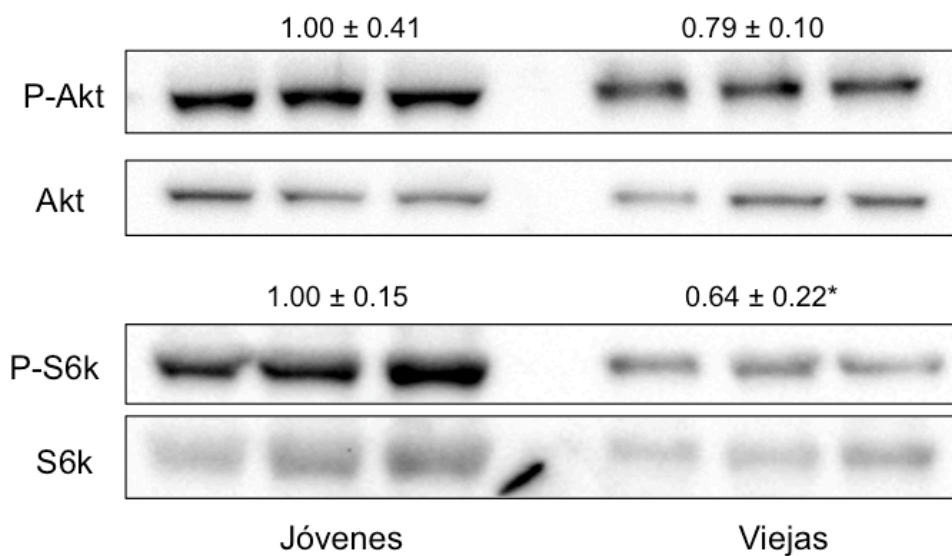


Figura 43: Cantidad de proteína de Akt, p-Akt, S6k, p-S6k en tejido adiposo de ratas jóvenes y ratas viejas. Prueba-t(*P<0.05).

6.16. Efecto del miR29b sobre la cantidad de proteína y estado de fosforilación de Akt, y S6k en adipocitos de ratas.

Para evaluar si la disminución de la fosforilación de S6K que se observó en el tejido adiposo de las ratas viejas se debe al incremento del miR29b, se determinó la cantidad de proteína y la fosforilación de Akt y S6K en adipocitos transfectados con el miR29b. En la figura 44 podemos observar una disminución significativa de la fosforilación tanto de Akt como de S6K en los adipocitos que fueron transfectados con el mimic del miR29b. Esto sugiere que el aumento del miR29b podría estar directamente relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina en tejido adiposo y el mecanismo puede involucrar la alteración en el metabolismo de los AACR.

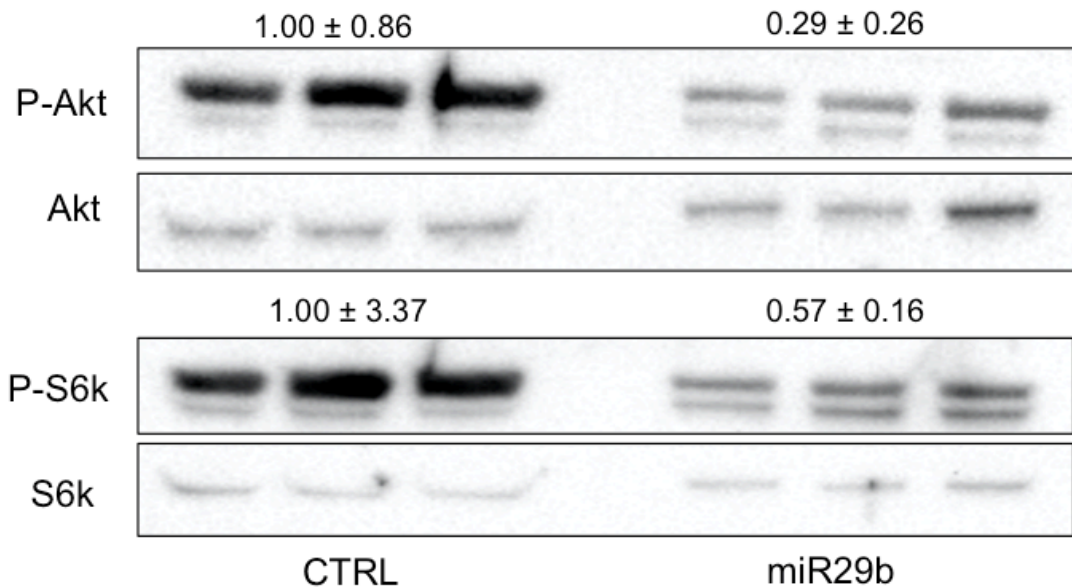


Figura 44: Cantidad de proteína de Akt, p-Akt, S6k, p-S6k en adipocitos transfectados con el mimic del miR29b. Prueba-t(*P<0.05, *P<0.001)

6.17. Efecto del miR29b y mTOR sobre el desarrollo de resistencia a la insulina en adipocitos de ratas.

Debido a la disminución en la fosforilación de Akt observada con la sobreexpresión del miR29b, evaluamos si se debe a una sobreactivación de mTOR secundaria a la alteración del metabolismo de los AACR. Nuestra hipótesis es que el miR29b al ser blanco directo de las enzimas encargadas del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, BCAT2 y BCKDH, disminuye la cantidad de estas, y por lo tanto

el metabolismo de los AACR. Esta disminución causaría la acumulación de los AACR como es la leucina. Se sabe que la leucina es un potente activador de mTOR por sus siglas en inglés (mammalian Target of Rapamycin). mTOR es una serina/treonina quinasa involucrada en diversos procesos fisiológicos como metabolismo celular, supervivencia y crecimiento celular, y autofagia. mTOR existe en dos complejos diferentes, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2). . La sobreactivación de mTOR estimularía la fosforilación de su blanco S6K causando una disminución en la fosforilación de Akt, y por tanto una disminución en la señalización de la insulina. En la figura 45 se puede ver un esquema que representa de manera gráfica el mecanismo propuesto por el cual el miR29b podría estar disminuyendo la fosforilación de Akt.



Figura 45: Esquema posible mecanismo disminución de la cantidad de p-Akt por presencia del miR29b.

Para probar esta teoría transfectamos adipocitos con el miR29b y los incubamos con TORIN para inhibir el complejo mTOR. Posteriormente obtuvimos la proteína y realizamos un western blot para medir tanto la fosforilación de Akt como de S6k. En la figura 46 podemos ver que en los adipocitos que fueron transfectados con el mimic del miR29b presentan una disminución significativa de la fosforilación de Akt

en comparación con el grupo control como ya se había observado antes. Sin embargo, al incubar los adipocitos transfectados con el mimic del miR29b con TORIN, la disminución en la fosforilación de Akt desaparece, por lo que se podría concluir que la disminución de la fosforilación de Akt por presencia del miR29b es dependiente del complejo mTOR. En cuanto a la fosforilación de S6K, podemos observar que los adipocitos transfectados con el miR29b e incubados con TORIN presentan una disminución significativa con respecto al grupo control, una vez más comprobando la participación de mTOR.

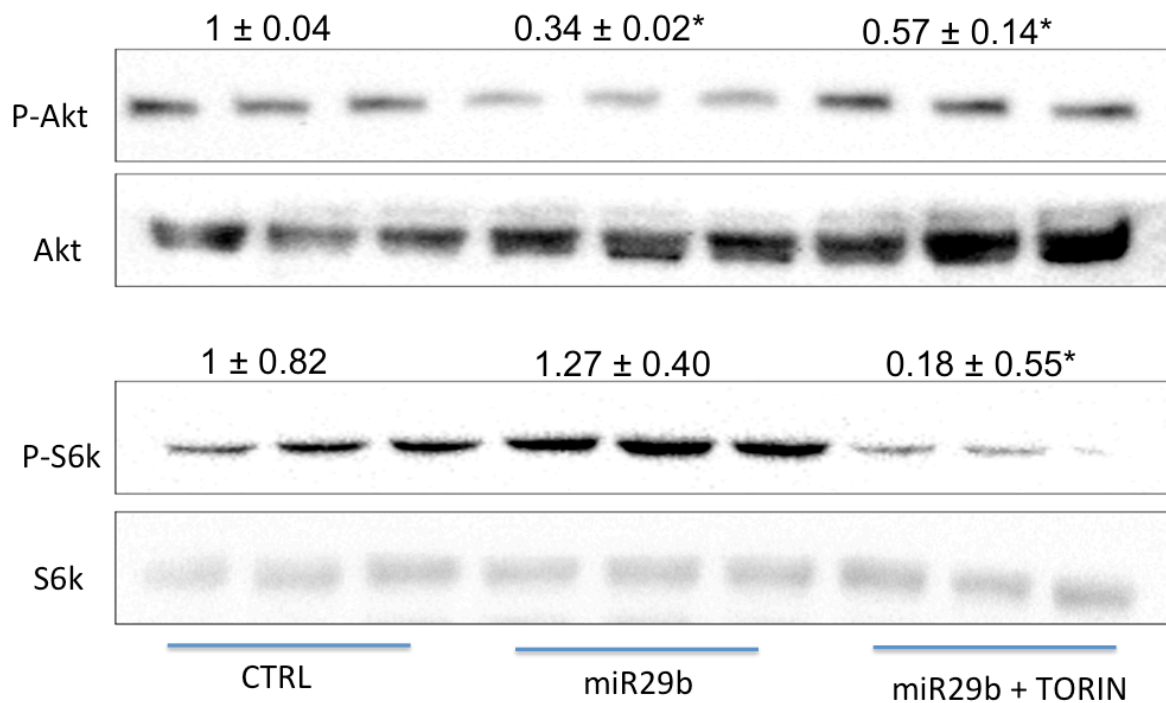


Figura 46: Cantidad de proteína de Akt, p-Akt, S6k, p-S6k en adipocitos transfectados con el mimic del miR29b. Prueba-t(*P<0.05, *P<0.001)

7.Discusión:

En numerosos estudios se ha observado que durante la obesidad y el envejecimiento existe un aumento de las concentraciones plasmáticas de AACR (30,38,39,). Las concentraciones elevadas de los AACR se han asociado contundentemente a la aparición de resistencia a la insulina. El mecanismo por el cuál se elevan los ACCR en estas dos condiciones sigue siendo un enigma. Una de las teorías más aceptada hasta la fecha es la disminución de las enzimas encargadas de metabolizarlos, la BCAT2 y la BCKDH, especialmente en el tejido adiposo (39,40). Sin embargo, se desconocen los factores que regulan a la baja la expresión de dichas enzimas. La evidencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la actividad de BCAT2 y BCKDH es regulada a dos niveles: de forma alosterica y a nivel postraducciona por un microRNA. En cuanto a la regulación de forma alosterica esta es mediada por diferentes concentraciones de metabolitos, ya que las concentraciones elevadas de palmitato modifican el destino metabólico de la leucina, y viceversa, las concentraciones elevadas de leucina modifican el destino metabólico del palmitato en los adipocitos.

Interesantemente, la leucina aumentó la cantidad de palmitato que se incorporó a la fracción lipídica. El palmitato se esterifica con el glicerol para formar triglicéridos en los adipocitos. Cuando hay concentraciones altas de palmitato disponibles en la célula, se produce y suministra glicerol debido a un aumento en la gliceroneogénesis (53). Durante el ayuno, cuando la glucosa disminuye, se utilizan

otras fuentes para la gliceroneogénesis, como el lactato, y otros aminoácidos como la alanina. Nuestros resultados sugieren que el exceso de leucina podría proporcionar la gran cantidad de ATP e intermediarios del TCA que requiere la gliceroneogénesis. De manera interesante, la incorporación del palmitato a la fracción lipídica disminuyó significativamente en los adipocitos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, probablemente debido a la disminución de las enzimas catabólicas de los AACR como se ha reportado en el tejido adiposo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, lo que conlleva a una disminución en la oxidación de los AACR.

Por otro lado, la leucina disminuyó la oxidación del palmitato, probablemente como resultado de un aumento del pool intracelular de acetil-CoA, que a su vez podría estar aumentando la cantidad de malonyl coA y por lo tanto la inhibición de CPT1a, causando un cuello de botella en la beta -oxidación. Muoi et al demostraron en modelos murinos de obesidad que las mitocondrias se encuentran saturadas y presentan una alta tasa de oxidación incompleta que resulta en la acumulación de acilcarnitinas en diferentes tejidos . En conjunto, esto sugiere que el catabolismo de los AACR puede afectar el pool intracelular de acetil-coA, lo que provoca un flujo mitocondrial más intenso, similar a lo que ocurre durante la inflexibilidad metabólica (54).

Adicionalmente, también observamos que la leucina disminuyó la cantidad de palmitato que se incorporó a la fracción de proteica. El palmitato se puede

incorporar a la fracción proteica a través de dos vías: (1) síntesis de glutamato a partir del alfa-cetoglutarato, y 2) palmitoilación, una modificación proteica en la que el palmitato se une de manera covalente al grupo amino de un residuo de cisteína o, en menor grado, de serina y treonina. La palmitoilación es una modificación reversible y dinámica, que facilita la interacción entre proteínas y membranas celulares. Una proteína palmitolada posee una parte hidrófoba, que sirve de ancla, lo cual facilita las interacciones proteína-membrana y proteína-proteína, regulando así el tráfico de proteínas y la señalización intracelular. En un estudio reciente, Ren et al encontraron más de 800 proteínas palmitoladas mediante un análisis proteómico en tejido adiposo y en adipocitos 3T3-L1. Entre las proteínas palmitoladas se encontraban diferentes transportadores y moléculas involucradas en el metabolismo de la glucosa, como el GLUT4 (55), lo que demuestra que la palmitoilación desempeña un papel importante en la captación de glucosa mediada por el GLUT4 en respuesta a la insulina. El hecho de que el aumento de la concentración de leucina reduzca la palmitilación de proteínas en los adipocitos sugiere que la leucina podría afectar la funcionalidad de las proteínas reguladas por la palmitoilación y representa un mecanismo por el cual altas concentraciones de AACR pueden conducir a la resistencia a la insulina, lo cual aun no ha sido explorado.

Por otro lado, observamos que, al aumentar la concentración de palmitato, disminuyó la incorporación de leucina a la fracción lipídica. La leucina participa en la síntesis de lípidos; contribuyendo alrededor del 30% del pool lipogénico de acetil-

coA (56). El acetil-CoA se puede convertir en malonyl-CoA por medio de la acetil-coA carboxinasa (ACC). El malonil-CoA es el sustrato preferido de la sintasa de ácidos grasos (FAS). La ACC y la FAS se regulan de forma alostérica por la cantidad de sus productos, malonil-CoA y palmitato, respectivamente. Por lo que, cuando los niveles de palmitato son altos, como es el caso de nuestros experimento, la ACC se inhibe de forma alostérica para prevenir la síntesis de ácidos grasos, disminuyendo la incorporación de leucina en el fracción lipídica. De igual manera, las altas concentraciones de palmitato incrementaron la fosforilación de ACC, inactivandola en los adipocitos primarios. Además de los ácidos grasos, el esqueleto de carbono de la leucina puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de fosfolípidos y colesterol. El aumento observado en la HMGCoA reductasa sugiere que el colesterol es un producto potencial de la incorporación de leucina en la fracción lipídica. Esta hipótesis es apoyada por Halama et al., quienes demostraron que las enzimas sintetizadoras de colesterol que utilizan 3-hidroxi3-metilglutaril-CoA como sustrato, el cual es un intermediario del catabolismo de la leucina, aumenta durante la adipogénesis (57). Sin embargo, se necesitan más estudios para caracterizar de forma precisa la contribución real de la leucina a cada especie lipídica que se ve afectada por las altas concentraciones de palmitato.

Los resultados de este estudio tienen importantes implicaciones fisiológicas. El tejido adiposo funciona como un reservorio, almacenando el exceso de energía en forma de triglicéridos a través de la gliceroneogénesis y la esterificación. Adicionalmente, el tejido adiposo también es capaz de metabolizar a los AACR,

modulando así sus niveles circulantes. El almacenamiento eficiente de las calorías en el tejido adiposo evita la disponibilidad excesiva de sustratos energéticos para el hígado o el músculo (58). Sin embargo, la obesidad conduce a la hipertrofia de los adipocitos, lo que causa diferentes alteraciones metabólicas del tejido adiposo, provocando la resistencia a la insulina y la inflexibilidad metabólica. El perfil metabólico durante la obesidad y la resistencia a la insulina se caracteriza no solo por el aumento en las concentraciones circulantes de glucosa y ácidos grasos libres, sino que también por el aumento de las concentraciones de los AACR. Nuestros hallazgos en los adipocitos primarios de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa muestran una capacidad alterada para metabolizar la leucina y el palmitato, reduciendo su incorporación a proteínas celulares o lípidos. Por lo tanto, el aumento de los AACR y los ácidos grasos, característico de los sujetos con obesidad, pueden ser resultado de la utilización deficiente de los adipocitos hipertróficos.

En cuanto a la regulación a nivel postranscripcional encontramos que, al igual que en otros estudios, la BCAT2 y la BCKDH se encuentran disminuidas en diversos tejidos. De manera interesante, la disminución de BCAT2 y BCKDH esta asociada con un incremento en la expresión del miR29b. La sobreexpresión de este ultimo disminuye la expresión génica tanto de BCAT2 como de BCKDH, y además, se une de manera específica a la región 3'UTR de BCAT2 causando su degradación. De los resultados obtenidos llama la atención que la actividad de la luciferasa

disminuye en el plásmido PGL3-3'UTR BCAT2 incluso sin la presencia del mimic, lo cual se podría explicar por la presencia del miR29b en forma basal, ya que Danner et al han demostrado la expresión endógena del miR29a y miR29b en las células Hek293. En conjunto, los resultados demuestran que la disminución de las enzimas BCAT2 y BCKDH se debe a un incremento del miR29b.

Finalmente, los resultados de este estudio proponen un mecanismo que explica la causalidad entre los AACR y la resistencia a la insulina mediado por el miR29b. En el 2007, He et al examinaron por medio de microarreglos los perfiles de expresión de miRNAs de los músculos esqueléticos de ratas sanas y ratas diabéticas Goto-Kakizaki, e identificaron cuatro miRNAs regulados a la alta en las ratas Goto-Kakizaki en comparación con las ratas sanas (59). Entre los miRNAs regulados a la alta se encontró el miR29b. La sobreexpresión del miR29b se asoció a una disminución en la fosforilación de Akt . De igual manera, en el 2015 Liu et al demostraron que la sobreexpresión del miR29b en hepatocitos redujó la fosforilación de Akt, similar a la reducción de la fosforilación de Akt observada en hígado de ratones alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa (60). Todos estos estudios sugieren que el miR29b podría regular de forma negativa la señalización de insulina, presumiblemente mediante la inhibición de la activación de Akt. Sin embargo, se ha demostrado que Akt no es un gen blanco directo del miR29b, por lo que se sugiere que los efectos negativos del miR29b en la señalización de la insulina podrían estar mediados por otro mecanismo intermedio. Nuestro trabajo demuestra que este mecanismo involucra la alteración del

metabolismo de los AACR. Es decir, la presencia del miR29b disminuyó la cantidad de la BCAT2 y BCKDH, y por ende, ocasiona que se acumulen los AACR en plasma y en las células. Esta acumulación lleva a la sobreactivación de mTOR, ya que la leucina es uno de sus activadores más potentes. La sobreactivación de mTOR generará en consecuencia la resistencia a la insulina, ya que al inhibir a mTOR en presencia del miR29b se mantiene la activación de Akt.

Nuestro trabajo demuestra que la BCAT2 y la BCKDH son enzimas que se regulan tanto a nivel alosterico por las concentraciones elevadas de palmitato, y a nivel postrancricional por la presencia del miR29b. Esto es de mucha utilidad ya que permite plantear estrategias de cómo restablecer la expresión de BCAT2 y BCKDH durante la obesidad y el envejecimiento y así normalizar los niveles plásmaticos de los AACR y prevenir la aparición de la resistencia a la insulina.

8. Conclusión

El destino metabólico de la leucina y el palmitato están relacionados y se ven afectados por la presencia y concentración de uno u otro. La administración de una dieta alta en grasa afecta crónicamente al adipocito modificando la interacción entre leucina y palmitato y, en consecuencia, el destino metabólico de ambos.

La BCAT2 y la BCKDH se encuentran disminuidas en modelos de obesidad y de envejecimiento de manera tejido específico, asociado aun incremento del miR29b en ambos modelos. El miR29b se une a la porción 3-UTR de la BCAT2 y por tanto modula la expresión de BCAT2. Además, el miR29b se asocia a la resistencia a la insulina ya que disminuye la fosforilación de Akt y el almacenamiento de lípidos por un mecanismo dependiente del metabolismo de AACR y mTOR.

En general, nuestros resultados indican que la alteración en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en ratas con dieta alta en grasa y durante el envejecimiento se debe a la presencia de altas concentraciones de palmitato y a una menor expresión de las enzimas BCAT2 y BCKDH ocasionada por la presencia del miRNA29b.

9. Agradecimientos:

A mi tutora: Dra. Lilia Guadalupe Noriega López

A todos los del Departamento de Fisiología de la Nutrición

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,

Universidad Nacional Autónoma de México

Al CONACYT

10. Bibliografía:

1. NORMA Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998. Publicada el 12 de abril de 2000.
2. OMS. www.who.int/nut/obs.html.
3. Dorantes A. Endocrinología clínica. 3era edición. Manual moderno, México: 2008. Pgs 267-280.
4. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414(6865): p. 799-806.
5. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type2 diabetes. *Nature* 2006. 444(7121): p.840-6.
6. Olivares JA, Arellano A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. 2008; 27(1): 9-18..
7. King M. Acción de la insulina. The medical biochemistry page. 2011. Disponible en:<http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/insulin-sp.html>
8. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994, 372(6508):746-754.
9. Wite MF, Shoelson SE, Keutmann H, Cahn SR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J.Biol.Chem.* 1988; 263 (6):2969-2980.
10. Abbas Ak, Litchman H, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. W.B Saunders Company. 1994.

11. Cruz M, Velasco E, Kumate J. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gac Méd Méx.* 2011. 137 (2): 135-146.
12. Shepherd PR, Whithers Dj, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333:471-490.
13. Meshkani, R. and K. Adeli, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*, 2009. 42(13-14):1331-46.
14. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*. 2nd Edition ed. 1993: Worth Publishers.
15. L STRYER, JM BERG, JL TYMOCZKO. "Bioquímica" (5ª ed), Ed Reverte. Barcelona 2003.
16. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiological Reviews*. 1983.63(4):1421-46.
17. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial b-oxidation. *Biochem. J.*(1996) 320: 345- 357.
18. Voet D, Pratt CW. "Fundamentals of Biochemistry", John Wiley & Sons Inc, 1999.
19. Peña L, Sanjurjo P. Aproximación diagnóstica y tratamiento de los errores innatos de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos. *Anales Españoles de Pediatría*. 2001 (55):524-534.
20. Chavez J.A, Summers S.A. Characterizing the effects of saturated fattyacids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol

accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. Arch. Biochem. Biophys. 2003; 419:101–109.

21. Chavez J.A, Knotts T.A, Wang L.P, Li G, Dobrowsky R.T, Florant G.L, Summers S.A. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fattyacids. J. Biol. Chem. 2003; 13:10297–10303.

22. Powell D.J, Hajduch E, Kular G, Hundal H.S. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta- dependent mechanism. Mol. Cell. Biol. 2003; 23: 7794–7808.

23. Summers S.A, Garza L.A, Zhou H, Birnbaum M.J. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. Mol. Cell. Biol. 1998; 18:5457–5464.

24. Yu C, Chen Y, Cline G.W, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim J.K, Cushman S.W, Cooney G.J *et al.* Mechanism by which fattyacids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J. Biol. Chem. 2002; 277: 50230–50236.

25. Kim J.K, Fillmore J.J, Sunshine M.J, Albrecht B, Higashimori T, Kim D.W, Liu Z.X, Soos T.J, Cline G.W, O'Brien W.R *et al.* PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance J. Clin. Invest. 2004; 114: 823–827.

26. Meshkani, R. and K. Adeli, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*, 2009. 42(13-14): 1331-46.
27. DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*. 2004; 143:9-21.
28. Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Rev*.2002;18:S5-S9.
29. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5(5):545-549.
30. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *CellMetab*.2009;9:311-26.
31. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. *Annu Rev Nutr*, 1984. 4: p. 409-54.
32. Shimomura, Y., et al. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2001. 4(5): p. 419-23.
33. Hutson, S.M., D. Fenstermacher, and C. Mahar. *J Biol Chem*, 1988. 263(8): p. 3618-25.
34. John T. Brosnan, Margaret E. Brosnan, Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation, *The Journal of Nutrition*, 2006.136 (1): p.207-211.

35. Herman MA, She P, Peroni OD, Lynch CJ, Kahn BB. Adipose tissue branched chain amino acid (BCAA) metabolism modulates circulating BCAA levels. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11348–11356.
36. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease [published correction appears in *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-371]. *Cell*. 2017;168(6):960–976.
37. <http://www.genenetwork.org/>.
38. Houtkooper RH, Argmann C, Houten SM, et al. The metabolic footprint of aging in mice. *Sci Rep*. 2011;1:134.
39. She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(6):E1552–E1563.
40. Serralde-Zúñiga AE, Guevara-Cruz M, Tovar AR, et al. Omental adipose tissue gene expression, gene variants, branched-chain amino acids, and their relationship with metabolic syndrome and insulin resistance in humans. *Genes Nutr*. 2014;9(6):431.
41. Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012;4(6):565–583.
42. Pabón-Martínez Y. Vladimir. MicroARNs: una visión molecular. *Rev. Univ. Ind. Santander*. 2011;43 (3): 289-297.

43. Koscianska E, Starega-Roslan J, Krzyzosiak WJ. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One*. 2011;6(12):e28548.
- 44 Iacomino G, Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr*. 2017;12:23.
45. Julie Massart, Rasmus J.O. Sjögren, Leonidas S. Lundell, Jonathan M. Mudry, Niclas Franck, Donal J. O’Gorman, Brendan Egan, Juleen R. Zierath, Anna Krook. Altered miR-29 Expression in Type 2 Diabetes Influences Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Diabetes* Jul 2017, 66 (7) 1807-1818.
46. Mersey, Benjamin & Jin, Peng & Danner, Dean. Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain -ketoacid dehydrogenase complex in a cell. *Human molecular genetics*. 2005. 14.(22):3371-7.
47. Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:375-80.
48. Breil C, Abert Vian M, Zemb T, Kunz W, Chemat F. "Bligh and Dyer" and Folch Methods for Solid-Liquid-Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):708.
49. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab*. 2017;25(5):1027–1036.

50. Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301:215–290.
51. Lee CG, Boyko EJ, Strotmeyer ES, et al. Association between insulin resistance and lean mass loss and fat mass gain in older men without diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(7):1217–1224.
52. Esslinger SM, Schwalb B, Helfer S, et al. Drosophila miR-277 controls branched-chain amino acid catabolism and affects lifespan. *RNA Biol.* 2013;10(6):1042–1056.
53. 47. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, et al. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 2003;278:30413–6.
54. Muoio DM. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell* 2014;159:1253–62.
55. Ren W, Jhala US, Du K. Proteomic analysis of protein palmitoylation in adipocytes. *Adipocyte* 2013;2:17–28.
56. Munday MR, Hemingway CJ. The regulation of acetyl-CoA carboxylase a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:205–34.
57. Halama A, Horsch M, Kastenmuller G, Moller G, Kumar P, Prehn C, et al. Metabolic switch during adipogenesis: from branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2016;589:93–107.

58. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:209–14.
59. Bing Huang, Wenming Qin, Botao Zhao, Yi Shi, Chengguo Yao, Jin Li, Huasheng Xiao, Youxin Jin, MicroRNA expression profiling in diabetic GK rat model, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2009. 42 (6): 472–477.
60. Jia Liu, Cheng Ye, Wei Liu, Wei Zhao, Ya-jing Zhang, Hong Zhang Hao Ying. AICAR enhances insulin signaling via downregulation of miR-29. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 94:199-205.

