



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CAMBIOS EN EL METABOLISMO Y PERFIL TRANSCRIPCIONAL NEURONAL TRAS
UNA EXPOSICIÓN A ÁCIDO PALMÍTICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. MANUEL FLORES LEÓN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ANA B. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX., Enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“The true sign of intelligence is not knowledge, but imagination and the important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing.”

- **Albert Einstein**

“Only a small percent of our longevity is genetically determined. The rest is what we do, how we live our lives and increasingly the molecules that we take. We’ve always known that our bodies are capable of healing themselves under the right conditions: Diet and exercise improve our health. So, what we’re all hoping to do, us researchers, is to develop ways to not really just extend lifespan but to keep people healthier for longer.”

- **David Andrew Sinclair**

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio C-210 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la tutoría de la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez. El desarrollo del proyecto tuvo el apoyo financiero del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA IN202615 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) A1-S9559 y 2900441. Durante la realización de este trabajo Manuel Flores León contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 449712, del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y de la beca para la obtención de grado otorgada por PAPIIT, DGAPA “IN202318” y “IN204621”.

Agradecimientos Institucionales

A la **Q.F.B Patricia Suyapa Ferrera Boza** por el apoyo técnico brindado durante la elaboración de esta tesis.

A la **Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda** por el apoyo brindado durante todos los estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité tutor, **Dr. Félix Recillas Targa** y **Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra**, por todo su valioso apoyo, acertados comentarios y su amplio conocimiento compartido a lo largo de la realización del proyecto.

Al **M.V.Z. Jorge Omar García Rebollar** y a la **Dra. Georgina Díaz Herrera** de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su amplia asesoría, apoyo y experiencia con los modelos animales.

Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez** de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su amplia asesoría y apoyo con el uso del microscopio confocal.

A los miembros del jurado de examen, **Dra. Susana Castro Obregón**, **Dra. Lorena Aguilar Arnal**, **Dra. Leonor Pérez Martínez**, **Dr. Juan Miranda Ríos** y **Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez**, por su tiempo, sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar la presente tesis.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (**M. en C. Norma Trejo Medina**, **Adelina González Pérez**, **Julio Ignacio Palacios Ordoñez**) por el excelente apoyo administrativo brindado.

Dedicatoria

A mi **madre**, por siempre ser ese apoyo incondicional que todos necesitamos e impulsarme a seguir mis sueños no importando lo lejos que me lleven o el tiempo que me tomen.

A mi **padre**, por estar presente en este largo camino de la vida y celebrar los éxitos.

A mi prima **Paola**, porque sin saberlo fuiste un gran apoyo en muchos aspectos en esta etapa académica y personal para poder realizar mis sueños y metas.

A **mí mismo**, por nunca rendirte, encontrar la luz en los momentos de oscuridad y por tener el valor de seguir tus sueños para sentirte pleno y feliz.

Agradecimientos personales

A la **Dra. Clorinda Arias** por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por todo el apoyo y confianza durante todos estos años que me impulsaron para tener una excelente formación científica. Este trabajo es fruto de su excelente mentoría y el reflejo de la ética profesional y calidad humana con la que se maneja y transmite a los estudiantes.

Al **Dr. Rodrigo González** por el apoyo incondicional y la infinita confianza. Desde hace muchos años es un excelente amigo, mentor y maestro de vida. Su amistad y consejos siempre serán parte esencial de mi carrera profesional. Toda mi admiración.

A todos los miembros del **laboratorio C-210** por todas las risas, consejos y apoyo durante estos años que compartimos.

A la **Dra. Angélica Zepeda** por todos los consejos académicos y de vida, así como las pláticas que ayudaban a poner en perspectiva muchas decisiones.

Al **Prof. Dr. Tiago Outeiro** por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de continuar aprendiendo y crecer como científico.

Índice

Abstract.....	9
Resumen.....	10
Abreviaturas	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Las dietas altas en grasa y carbohidratos como factor de riesgo para múltiples enfermedades.....	12
1.2 Bioquímica de los lípidos: la fisiología de los ácidos grasos saturados	13
1.2.1 Los efectos pleiotrópicos del ácido palmítico en la célula	18
1.2.2 Mecanismos neuronales afectados por las HFD y su relación con la neurodegeneración	22
1.2.3 Metabolismo del AP en neuronas	24
1.3 Integración de los efectos de las HFD y el AP a través del transcriptoma.....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general.....	28
4.2 Objetivos particulares	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Cultivo celular	29
5.1.1 Soluciones necesarias para realizar el cultivo primario de neuronas	30
5.2 Tratamiento de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo	31
5.3 Ensayo de actividad oxido-reductora mitocondrial (reducción de MTT).....	31
5.4 Cuantificación del consumo de glucosa	31
5.5 Cuantificación de la relación NAD ⁺ /NADH.....	31
5.6 Cuantificación de la tinción de Rojo Oleoso O	32
5.7 Western Blot	32
5.7.1 Descripción de Anticuerpos utilizados para Western Blot	32
5.8 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	33
5.8.1 Secuencias de los primers.....	33
5.9 Secuenciación de RNA	34
5.10 Análisis del RNAseq.....	34
5.11 Ensayo tipo Fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRF) para la actividad de BACE1	34

5.12 Inmunofluorescencia	34
5.12.1 Tratamiento de cubreobjetos para cultivo de neuronas.....	35
5.13 Microscopía confocal y cuantificación de la distribución de BACE1	35
5.14 Fraccionamiento nuclear	35
5.15 Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	36
6.1 Cambios metabólicos en las neuronas hipocampales tras la exposición a AP.	36
6.2 El AP se asocia con una disminución en el contenido y actividad de SIRT1.	37
6.3 La actividad y localización de BACE1 se modifican cuando las neuronas son expuestas al AP.....	38
6.4 La morfología neuronal no se altera con una dosis no citotóxica de AP	39
6.5 El AP genera cambios en el perfil transcripcional de las neuronas.....	40
6.6 Activación de vías inflamatorias y cambios en el metabolismo lipídico neuronal inducidos por la exposición a AP	42
6.7 Genes involucrados en el metabolismo de lípidos y regulados por la vía de PPAR alteran su expresión en neuronas expuestas a AP	44
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES.....	51
9. REFERENCIAS.....	53
10. ANEXOS	67
11.1 Anexo 1: Morfología neuronal en condiciones control y después de 24 horas con AP. ..	67
11.2 Anexo 2: Análisis de componentes principales (PCA).....	68
11.3 Anexo 3: Resultados preliminares de las perspectivas: reclutamiento diferencial de factores de transcripción ante la exposición de AP en neuronas.....	69
11.4 Anexo 4: PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions.....	71
11.5 Anexo 5: Palmitic Acid-Induced NAD ⁺ Depletion is Associated with Reduced Function of SIRT1 and Increased Expression of BACE1 in Hippocampal Neurons.....	86
11.6 Anexo 6: Transcriptional Profiles Reveal Deregulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid.....	96
11.6.1 Anexo 7: Transcriptional Profiles Reveal Deregulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid. (Supplementary information)109	

Abstract

The chronic consumption of high fat diets has been established as an important risk factor for the development of pathologies like obesity, Diabetes Mellitus Type 2, insulin resistance and even neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease. Palmitic acid is the saturated fatty acid that is mostly found in these types of diets and has been found increased in the circulation and cerebrospinal fluid of obese and diabetic patients, as well as in the *postmortem* brain of Alzheimer's disease diagnosed patients. Even though palmitic acid has multiple non-toxic cellular functions, the excessive consumption accumulates in non-adipose tissues. This accumulation is associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation. Nevertheless, most of the published studies have been performed in peripheral tissues, such as liver, skeletal muscle, and pancreas and there is scarce information about its effects in the brain.

In the central nervous system, palmitic acid may contribute to neurodegenerative diseases through pathological aging, although the exact mechanisms for which this can happen have not been clarified completely. These mechanisms could involve the neuronal energy metabolism through proteins that respond to the presence of lipids, such as PPAR γ and SIRT1. Both proteins are important for the transcriptional regulation of genes implicated in processes that contribute to the development of biochemical markers of Alzheimer's disease. Nevertheless, there is scarce information about how the neuron integrates all the effects that palmitic acid causes and transcriptomic analyses could unravel new information. In the present work we evaluated the metabolic, transcriptomic, and cellular response of hippocampal neurons exposed to an elevated concentration of palmitic acid and whether these changes may contribute to the expression of biochemical markers of Alzheimer's disease.

We found that palmitic acid activates the neuronal energy metabolism by lowering glucose consumption, modifying the NAD⁺/NADH index and accumulating lipid droplets. Furthermore, this treatment diminishes SIRT1's content and activity, which is associated with the activation of p65. This activation might be related to the observed increase in the content of the β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1), as well as its increased activity and distribution in the neurites after the exposure to palmitic acid. Finally, the neuronal transcriptomic analyses demonstrate that lipid metabolic pathways and inflammation related pathways are being activated after the exposure to this fatty acid.

The results presented in this thesis provide, for the first time, evidence through transcriptomic analyses of how hippocampal neurons integrate the metabolic changes produced by palmitic acid and how these can alter processes involved in memory, learning and neuronal integrity, such as long-term potentiation, the regulation of neurotransmitter levels and axonal ensheathment. Furthermore, they add evidence of how some mechanisms through inflammatory components and the energy metabolism might be implicated in the reported effects that alter the central nervous system's biological processes. Altogether, the results here shed light on the role of the saturated fatty acids as a risk factor to develop neurodegenerative diseases.

Resumen

El consumo crónico de dietas altas en grasa es un factor de riesgo importante para el desarrollo de obesidad, diabetes mellitus tipo 2, resistencia a la insulina e incluso de enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer. El ácido palmítico es el ácido graso saturado que mayormente se encuentra en las dietas altas en grasa y se ha encontrado elevado en circulación y líquido cefalorraquídeo de pacientes con obesidad y diabetes, así como en el cerebro de pacientes *postmortem* con la Enfermedad de Alzheimer. A pesar de que el ácido palmítico tiene múltiples funciones celulares no tóxicas, el exceso en su consumo genera su acumulación en los tejidos no adiposos, teniendo efectos nocivos como la resistencia a la insulina, el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial y la inflamación. Sin embargo, hasta el momento la mayoría de los estudios se han realizado en tejidos periféricos como hígado, músculo y páncreas y se conoce poco sobre sus efectos en el cerebro.

En el sistema nervioso central, el ácido palmítico puede contribuir a la alteración de procesos celulares y moleculares asociados a enfermedades neurodegenerativas. Un mecanismo relevante podría ser a través de su metabolismo energético en neuronas. Dicho proceso involucra la desregulación de proteínas que responden a la presencia de lípidos como PPAR γ y SIRT1. Adicional a esto, ambas proteínas juegan un papel importante en la regulación de la transcripción de genes implicados en procesos que contribuyen a la aparición de marcadores bioquímicos de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, hasta la fecha se sabe poco sobre cómo las neuronas integran los efectos del ácido palmítico para alterar los procesos celulares y los análisis de transcriptoma podrían ayudar a resolver esta pregunta. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la respuesta metabólica, transcriptómica y celular de neuronas hipocampales expuestas a una concentración elevada de ácido palmítico y cómo contribuye lo anterior a la expresión de marcadores bioquímicos de enfermedad de Alzheimer.

En este trabajo se encontró que el ácido palmítico activa el metabolismo energético neuronal disminuyendo el consumo de glucosa, modificando el índice NAD⁺/NADH y acumulando gotas lipídicas. También se encontró una disminución en el contenido y actividad de SIRT1 y una activación de p65. Esta activación podría estar relacionada con el aumento de la cantidad de la β -secretasa 1 (BACE1), así como con el incremento en su actividad y su redistribución en las neuritas. Finalmente, los estudios del transcriptoma de neuronas mostraron la activación de vías involucradas en el metabolismo lipídico y vías de señalización inflamatorias ante la exposición a ácido palmítico.

Estos datos muestran por primera vez la integración de los efectos deletéreos del ácido palmítico sobre las neuronas hipocampales a través del análisis transcriptómico. Adicionalmente, se observa que dichos efectos a largo plazo podrían alterar procesos asociados con la memoria, el aprendizaje y el mantenimiento de la integridad neuronal, como la potenciación a largo plazo, la regulación en los niveles de neurotransmisores y la mielinización axonal. Además, este trabajo suma evidencia de algunos mecanismos implicados en la variedad de efectos estudiados a través de componentes inflamatorios y del metabolismo energético que pudieran estar afectando procesos biológicos del sistema nervioso central. En conjunto, los resultados de la presente tesis sugieren el papel de la exposición neuronal a los ácidos grasos saturados como factor de riesgo para patologías crónico-degenerativas del sistema nervioso central.

Abreviaturas

AMPK: cinasa dependiente de AMP	Glut3: Transportador de glucosa tipo 3	PARPs: poli-ADP-ribosil transferasas
AP: ácido palmítico	GO: Gene Ontology	PBS: Buffer de fosfatos salino
APP: Proteína Precursora del Amiloide	GSEA: Gene Set Enrichment Analysis	PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa
ARTs: ADP-ribosil transferasas	HDACs: desacetilasas de histonas	PKC: Proteína cinasa C
ATP: Adenosín Trifosfato	HDL: Lipoproteínas de alta densidad	PPAR: Receptor activado por proliferadores peroxisomales
A β : Péptido β -amiloide	HFD: dietas altas en grasa	PTM: Modificación post-traduccional
BACE1: β -secretasa	HFFD: dietas altas en grasa y azúcares procesados	PUFA: ácidos grasos poliinsaturados
BHE: Barrera hematoencefálica	Hmgcs2: Hidroximetilglutaril-CoA Sintasa	qRT-PCR: PCR en tiempo real cuantitativa
BSA: Albúmina de Suero Bovino	IL: Interleucina	rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosomal
cADPR: ADP-ribosil cíclico sintasas	IRS-1: sustrato del receptor a insulina 1	RE: Retículo endoplásmico
chREBP: Proteína de unión al elemento sensible a los carbohidratos	K310ac: acetilación de la lisina 310	Redox: Reducción-oxidación
CoA: Coenzima A	LDL: Lipoproteína de baja densidad	RNAseq: secuenciación de RNA
CHOP: factor de transcripción asociado al estrés del retículo endoplásmico	LincRNAs: RNAs intergénicos no codificantes largos	ROS: especies reactivas de oxígeno
CR: Restricción calórica	LTP: Potenciación a largo plazo	SFA: ácidos grasos saturados
CREB: proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc 1	MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2	SIRT1: Sirtuina 1
DAG: Diacilglicerol	MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos	SIRTs: Sirtuinas
DEGs: genes diferencialmente expresados	MP: Metilpalmitato	snRNAs: RNAs pequeños nucleares
DIV: Días <i>in vitro</i>	mRNA: Ácido ribonucleico mensajero	SPT: C-palmitoiltransferasa
DMT2: Diabetes mellitus tipo 2	MUFA: ácidos grasos monoinsaturados	SREBP1c: Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
EA: Enfermedad de Alzheimer	NAD ⁺ : Nicotinamida adenina dinucleótido, en su forma oxidada	TLR4: Receptor Tipo Toll 4
FABP: Proteínas de unión a ácidos grasos	NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido, en su forma reducida	TNF α : Factor de necrosis tumoral α
FATP: Proteínas transportadores de ácidos grasos	NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas
FFAR1: Receptor 1 de ácidos grasos libres		

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el número de personas con enfermedades metabólicas ha incrementado de manera alarmante en diversos países, como en Estados Unidos y México. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2016 a nivel mundial, cerca del 40% de los adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso y 13% obesidad, mientras que la obesidad y sobrepeso infantil se situaba entre el 10 y el 20%. La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar alteraciones metabólicas y es producto del consumo exagerado de calorías, particularmente de dietas altas en grasa (HFD) y azúcares procesados (HFFD) y de la falta de ejercicio y llevar una vida sedentaria.

Desde hace varios años el estudio de los efectos metabólicos causados por el consumo de HFD ha ganado gran interés ante los grupos de investigación por generar condiciones metabólicas crónico-degenerativas como la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), el síndrome metabólico, diversas dislipidemias y la resistencia a la insulina [1]. Aunado a esto, varios estudios epidemiológicos han correlacionado la resistencia a la insulina y la DMT2 con el incremento en la probabilidad de presentar deterioro cognitivo, la aparición de marcadores de envejecimiento patológico e incluso con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer (EA) [2]. Dado que el cerebro es un órgano de gran plasticidad y alta tasa metabólica es particularmente sensible a cambios en el metabolismo energético. Sin embargo, pocos estudios han abordado el impacto sobre la función neuronal que tienen ciertos nutrientes con alto contenido calórico, como los que componen a las dietas altas en grasas saturadas.

1.1 Las dietas altas en grasa y carbohidratos como factor de riesgo para múltiples enfermedades

El estudio de la composición de los nutrientes en diferentes tipos de dietas ha sido abordado ampliamente a fin de caracterizar el impacto que estos tienen sobre la función celular y la longevidad de los individuos. Estos estudios se han enfocado principalmente en el análisis de los componentes bioquímicos, la carga calórica y la bioenergética celular ante dos tipos de dietas: la HFD y las dietas de restricción calórica (CR).

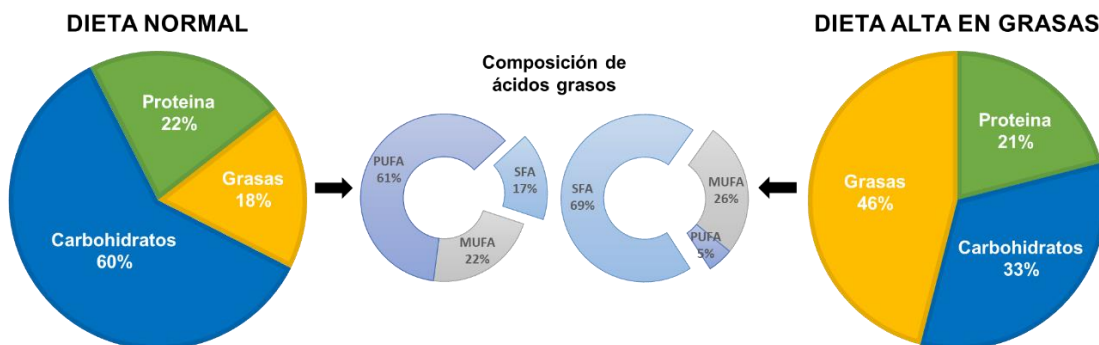


Figura 1 Comparación de la composición porcentual de una dieta "normal" (izquierda) y de una dieta alta en grasas (derecha). En medio se muestra el porcentaje de los diferentes tipos de ácidos grasos que componen a las grasas consumidas en estas dietas, como los ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

Una dieta normo-calórica varía entre los sujetos debido a los requerimientos individuales. Sin embargo, se establece que la composición promedio es de 60% carbohidratos, 18% grasas y 22% proteínas [3] (Fig. 1). Mientras que una dieta de CR mantiene estas proporciones pero se reduce la ingesta calórica entre 20 y 50% del consumo habitual, sin llegar a un estado de malnutrición, ni dejar de ingerir los nutrientes esenciales [4]. En comparación a estas dos dietas, una HFD, también llamada *Western Diet*, es una dieta que se basa en comidas procesadas con un alto contenido calórico que proviene a partir de

carbohidratos simples y grasas saturadas [5] (Fig. 1). Usualmente está compuesta por 33% carbohidratos, 46% grasas y 21% proteína [3].

Químicamente, las grasas se definen como acilgliceroles. Estos son compuestos en los cuales una molécula de ácido graso o grupo acilo está unido covalentemente a través de un enlace tipo éster a una molécula de glicerol [5]. La mayoría de los ácidos grasos se almacenan como triacilgliceroles (3 ácidos grasos unidos a 1 molécula de glicerol). Los ácidos grasos se pueden clasificar en tres grandes categorías: ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) [5]. La composición de las HFD es compleja, pero se caracterizan por tener un alto contenido de colesterol y SFA y un bajo contenido de PUFA (Fig. 1).

La reducción de nutrientes con alto contenido energético, como en las dietas CR, ha mostrado un incremento en la expectativa de vida de hasta un 50% más en diferentes especies como roedores, macacos, lémures y nemátodos [6–8]. Además, se ha descrito una mejoría en la condición física, mental, función de diferentes órganos y una disminución en patologías asociadas al envejecimiento, como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes e incluso enfermedades neurodegenerativas [9, 10]. Estos efectos se han asociado a la activación de vías de señalización sensibles a nutrientes como la de la insulina/IGF, mTOR y AMPK [11–14]. Aunado a esto, se han identificado enzimas y factores de transcripción que son reguladores clave para la homeostasis de los nutrientes. Tal es el caso de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB), Akt, Sirtuina 1 (SIRT1), la familia de factores de transcripción activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) y su coactivador, PGC1 α [15–17].

En humanos se sabe poco de los efectos a largo plazo de la dieta de CR [18–20], debido a que muchos procedimientos para la toma de muestra del tejido de interés son invasivos y el seguimiento de los individuos debe de realizarse durante años, lo que complica la obtención de los datos. Un estudio reciente muestra que en un periodo de dos años, esta dieta genera una adaptación metabólica y una reducción en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) [21], sugiriendo que las dietas CR también tienen un efecto benéfico a través de mecanismos asociados al envejecimiento como el estrés oxidante.

A comparación de la CR, el consumo crónico de HFD tiene efectos deletéreos como: dislipidemia, resistencia a la insulina, alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, incremento en el peso, inflamación sistémica y del sistema nervioso central, entre otros [1, 22–24]. Gran parte de los estudios realizados en roedores demuestran que los efectos antes mencionados se dan por la activación de vías de señalización asociadas a la inflamación, producción de citocinas, aumento de ROS, lipoperoxidación de membranas y proteínas, desregulación en la autofagia y por mecanismos asociados con la disfunción mitocondria y cambios en el transcriptoma [24–29].

A pesar de conocer los efectos nocivos que estas dietas tienen sobre la función celular, es importante conocer a detalle los mecanismos moleculares afectados en diferentes tejidos. Esto debido a que la mayoría de la información reportada aborda tejidos periféricos y muy poco los efectos sobre el sistema nervioso central. Aunado a esto y dada la complejidad en el contenido de moléculas de las HFD, diferentes componentes de estas se han comenzado a estudiar para precisar los mecanismos moleculares que se alteran y dado que los lípidos, particularmente los SFA, son el principal componente en las HFD es importante conocer su metabolismo para poder esclarecer la relación entre la ingesta de ellos y la disfunción neuronal.

1.2 Bioquímica de los lípidos: la fisiología de los ácidos grasos saturados

Los lípidos son biomoléculas hidrofóbicas que funcionalmente participan en diversos procesos como elementos estructurales de las membranas, señalización celular/hormonal, modificaciones post-traduccionales (PTM) y como moléculas/reservorio de energía [30]. Pueden dividirse en las siguientes categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, esfingolípidos, glicerofosfolípidos, glucolípidos, policétidos,

esteroles y lípidos de prenil (Fig. 2). Los lípidos que encontramos enriquecidos en las HFD son los SFA y el colesterol.

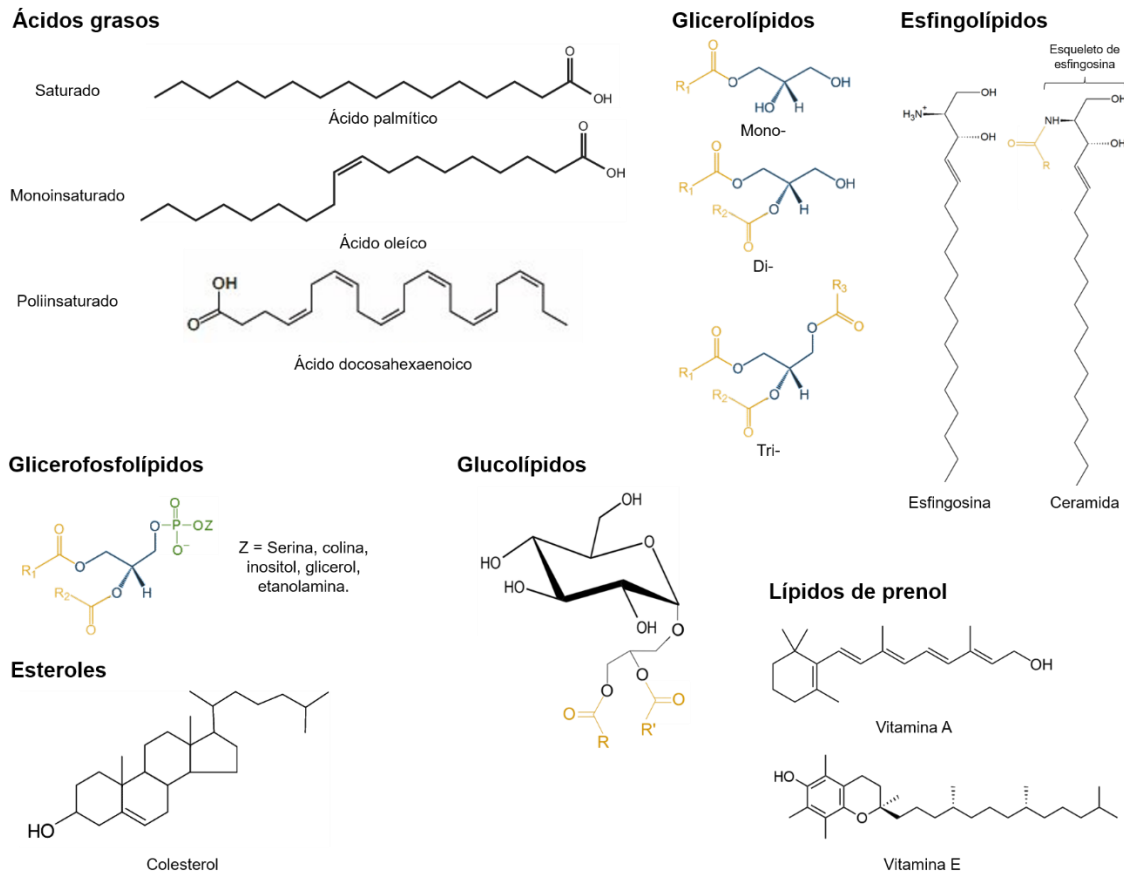


Figura 2 Química de los lípidos. Por cada tipo de lípido se muestran ejemplos de su estructura química. Las cadenas y sustituyentes (R) en amarillo corresponden a cualquier tipo de ácido graso, las cadenas azules señalan el esqueleto de glicerol y el sustituyente verde indica el enlace fosfato que se genera en los glicerofosfolípodos.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas alifáticas de 4 hasta 36 carbonos. Pueden existir sin dobles enlaces (completamente saturados, SFA) o con uno o más enlaces dobles (mono- o poliinsaturados, MUFA o PUFA respectivamente) (Fig. 2). Además, generan derivados importantes para la fisiología celular como los tri-, di-, monoglicéridos y fosfolípidos. Los ácidos grasos y sus derivados pueden ser ingeridos a través de la dieta o sintetizados a partir de aminoácidos, carbohidratos o de otros ácidos grasos. Cuando son provistos al cuerpo a través de la dieta, pasan por una serie de procesos bioquímicos para su absorción, utilización y/o almacenamiento. En el intestino delgado, por acción de las lipasas intestinales, los triacilglicéridos se descomponen en monoacilglicéridos, diacilglicéridos, SFA y glicerol. Dado que la única porción soluble es el grupo carboxilo ácido en un extremo, los SFA se emulsifican en micelas microscópicas formadas por las sales biliares para poder ser absorbidos por las células del intestino delgado (Fig. 3A-1). Al atravesar la mucosa intestinal para pasar a circulación sistémica, los SFA pueden permanecer libres/no esterificados unidos a proteínas acarreadoras (Fig. 3B-I), como la albúmina sérica o ser reconvertidos en triacilglicéridos y ser transportados con apolipoproteínas específicas en complejos llamados quilomicrones (Fig. 3B-II) [30]. Una vez en circulación, estos pueden llegar al cerebro al atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) [31, 32] mediante diferentes mecanismos (Fig. 3B) [33, 34]:

- 1) Por difusión pasiva, en donde unido a albúmina en su forma libre/no esterificada puede ser liberado y atravesar las membranas celulares [33, 35].

- 2) Con la ayuda de transportadores de ácidos grasos, como CD36, presentes en las células endoteliales. Estos transportadores pueden captar su forma libre/no esterificada y facilitar la internalización celular o su incorporación a dominios específicos de la membrana plasmática [33, 36].
- 3) Al estar unido a proteínas y esterificado en lípidos, como son las lipoproteínas, receptores específicos internalizan en vesículas estos complejos lipoproteicos y dentro de la célula son hidrolizados para ser liberados en su forma no esterificada [37].

En el citoplasma de las células endoteliales que forman la BHE, los ácidos grasos libres/no esterificados son captados por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Fig. 3C-4), las cuales mediante difusión facilitada (Fig. 3C-6) o proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (Fig. 3C-5) liberan a los ácidos grasos a las células del sistema nervioso central [38].

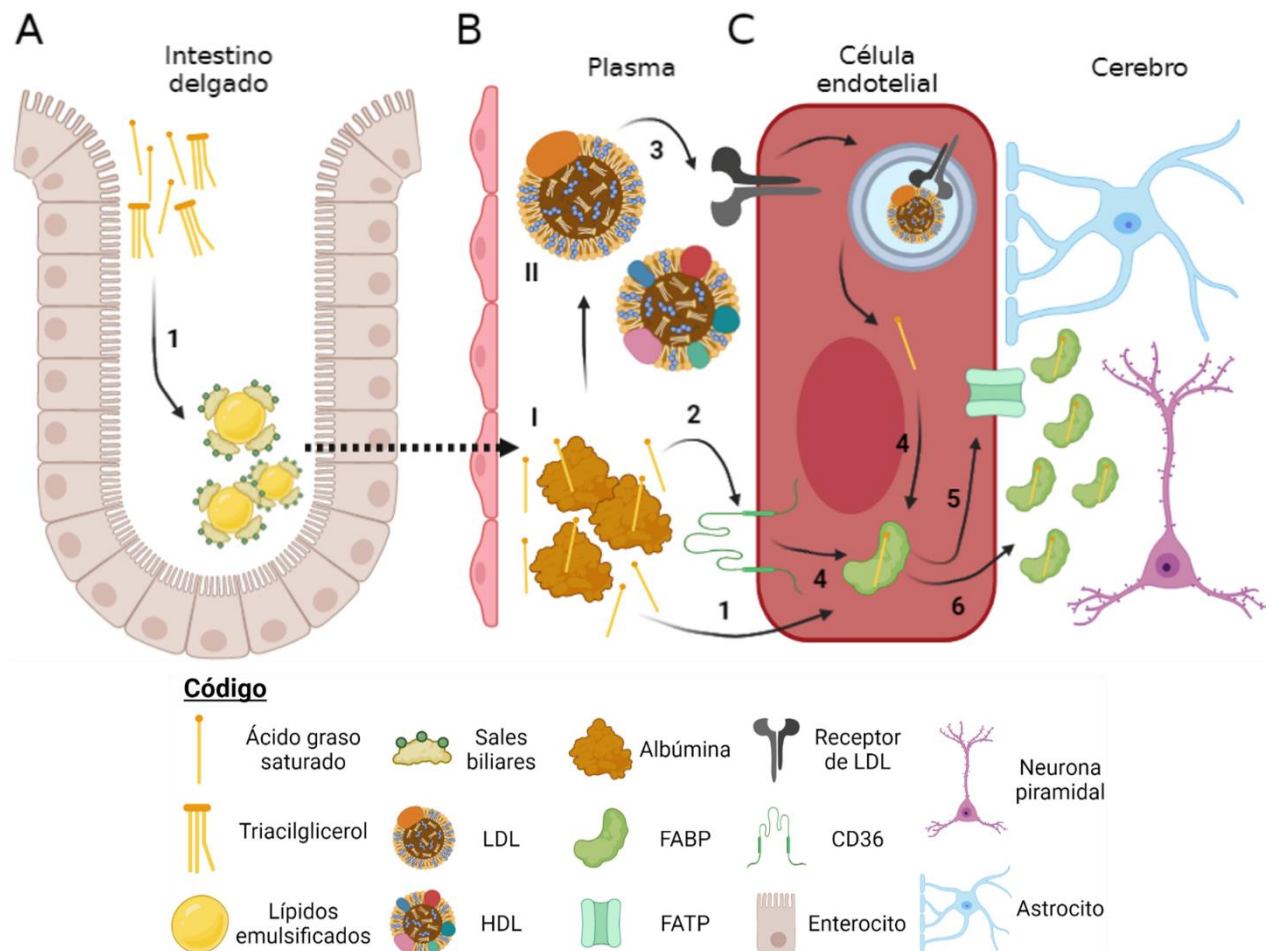


Figura 3 Absorción y transporte de lípidos. A) Los lípidos se absorben en el intestino delgado emulsificados en partículas microscópicas (1) donde las sales biliares son un componente importante de estas emulsiones. B) Estas partículas pasan a sistema linfático y circulación sistémica, donde pueden permanecer libres o unidos a albúmina (I) o en complejos proteicos (II), como son las lipoproteínas de alta (HDL) y/o baja densidad (LDL). El transporte de los SFA al interior de las células endoteliales que forman la BHE puede darse por difusión simple (1), a través de transportadores específicos de SFA (2) o por el reconocimiento y endocitosis de las lipoproteínas en vesículas (3). C) Finalmente, los SFA pueden liberarse de las lipoproteínas mediante hidrólisis y ser captados, así como los que fueron internalizados, mediante receptores o por difusión simple por FABP (4). Una vez que los SFA están en complejo con las FABP, mediante las FATP (5) o por difusión facilitada (6) son liberados al cerebro.

Una vez dentro de las células, los ácidos grasos pueden 1) almacenarse como lípidos esterificados o 2) mediante la β -oxidación generar la energía requerida por los tejidos. Cuando se almacenan lo hacen

principalmente en los adipocitos como triglicéridos en estructuras llamadas cuerpos o gotas lipídicas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las diferentes células del sistema nervioso central pueden formar gotas lipídicas, particularmente los astrocitos, pero también las neuronas [39, 40]. Estas estructuras globulares están formadas por una capa de fosfolípidos de la que también son parte proteínas integrales y periféricas específicas como enzimas biosintéticas de lípidos (por ejemplo, ACSL3), proteínas involucradas en proteólisis dependiente de ubiquitina (por ejemplo, AUP1), proteínas de la familia de las perilipinas (por ejemplo, perilipina 3/4) [41, 42]. Las gotas lipídicas se forman a partir del retículo endoplásmico (RE) y mantienen contacto con otros organelos como la mitocondria, los peroxisomas y los lisosomas [41]. Entre las funciones de los cuerpos lipídicos destacan ser un reservorio de energía y de protección contra la lipotoxicidad. Cuando los tejidos necesitan aumentar el metabolismo energético, ante la señalización de hormonas, como la epinefrina, los ácidos grasos se movilizan de los cuerpos lipídicos mediante lipólisis y dentro de la mitocondria son oxidados y proveen energía a través de la β -oxidación [30]. Por otro lado, al ser capaces de secuestrar a los ácidos grasos evita la formación de especies que en grandes concentraciones son lipotóxicas, como las ceramidas, acilcarnitina y diacilglicerol (DAG) [43, 44].

La mayoría de los SFA consumidos en la dieta no pueden atravesar libremente las membranas mitocondriales. Dado esto, los SFA mayores a 14 carbonos necesitan de 3 reacciones enzimáticas para utilizar la lanzadera de carnitina. El ácido palmítico (AP) es un SFA largo de 16 carbonos que requiere ser procesado mediante estas reacciones enzimáticas (Fig. 4A). La primera reacción enzimática es llevada a cabo por diferentes isoenzimas de la acil coenzima A (CoA) sintetasa. Estas isoenzimas son específicas para los ácidos grasos con diferentes longitudes (cortos, intermedios o largos) y se localizan en la membrana exterior mitocondrial. Mediante ATP con un enlace tioéster, una CoA se une covalentemente al AP generando el acil-CoA (Fig. 4A-1). Una vez generado este acil-CoA, en la segunda reacción la carnitina aciltransferasa I mediante una reacción de transesterificación lo conjuga con una carnitina formando el palmitoil-carnitina (Fig. 4A-2). Esta molécula pasa al espacio intermembrana de la mitocondria a través de grandes poros mitocondriales y hacia la matriz mitocondrial con ayuda del transportador acil-carnitina/carnitina por difusión facilitada. Finalmente, dentro de la matriz mitocondrial el ácido graso unido a la carnitina es transesterificado de regreso a una CoA por acción enzimática de la carnitina aciltransferasa II (Fig. 4A-3), generando nuevamente el acil-CoA que ahora puede ser β -oxidado para la obtención de energía [30].

La β -oxidación es una vía catabólica energética que en mamíferos puede proveer hasta el 80% de la energía en condiciones fisiológicas. Esta se lleva a cabo en la matriz mitocondrial o en organelos llamados peroxisomas. Este proceso comprende cuatro reacciones enzimáticas en las que se obtienen dos carbonos en forma de acetil-CoA. Posteriormente, los acetil-CoA obtenidos entran al ciclo de Krebs para continuar con la oxidación y poder generar ATP en la fosforilación oxidativa (Fig. 4B). Este proceso genera una gran cantidad de energía comparado con la glucólisis. Por ejemplo, 1 molécula de AP genera 8 moléculas de acetil-CoA que generarán 106 moléculas de ATP, mientras que 1 molécula de glucosa genera 2 moléculas de acetil-CoA y aproximadamente 30 moléculas de ATP [30].

La acetil-CoA generada a partir de la β -oxidación también puede ser utilizada en la síntesis de los cuerpos cetónicos: acetona, acetoacetato y D- β -hidroxibutirato (Fig. 4B). El primer paso es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por acción enzimática de la Tioalasa formando acetoacetil-CoA. Esta molécula se condensa hidrolíticamente con otra de acetil-CoA y forma β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Este paso es llevado a cabo por la enzima Hidroximetilglutaril-CoA sintasa (HMGCS2) y es considerado como el iniciador y limitante en la formación de cuerpos cetónicos. Finalmente, el HMG-CoA es procesado enzimáticamente por la Hidroximetilglutaril-CoA liasa para generar acetoacetato y acetil-CoA. Adicional a esto, el acetoacetato puede ser reducido por acción de la D- β -hidroxibutirato deshidrogenasa para generar D- β -hidroxibutirato [30].

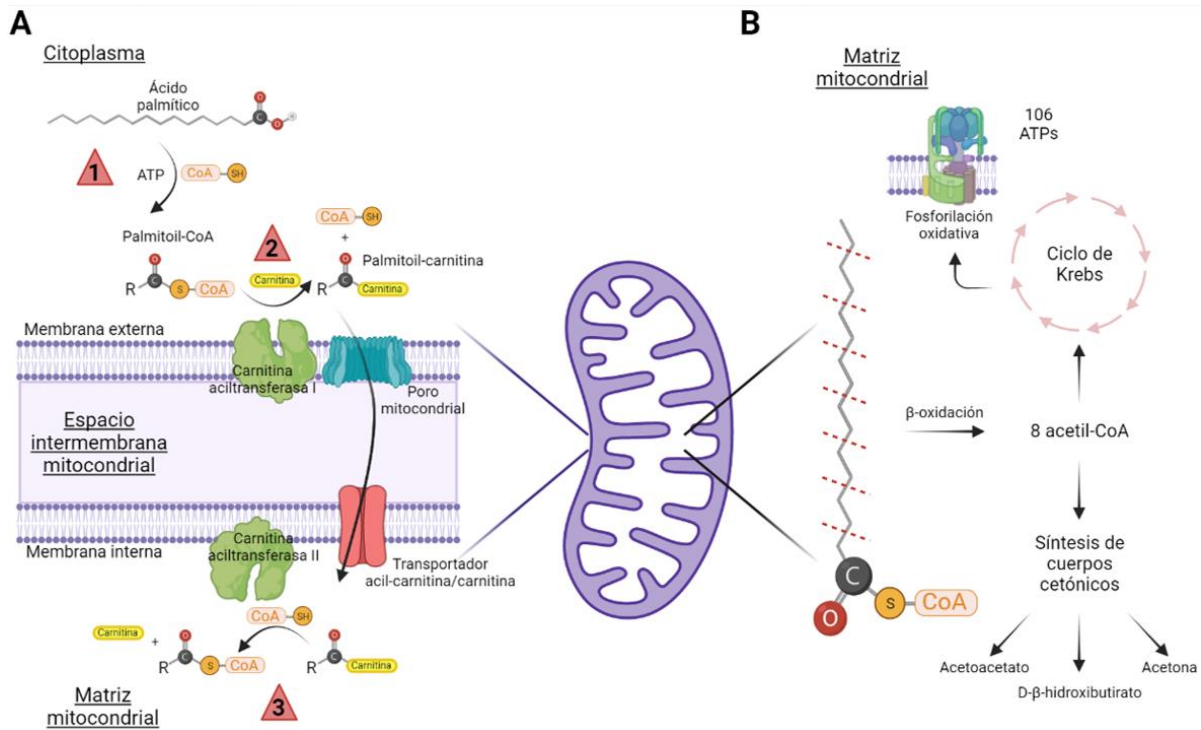


Figura 4 Activación y catabolismo de ácidos grasos saturados. Se utiliza al AP como ejemplo. A) Los ácidos grasos saturados tienen que ser convertidos a un acil-CoA (1), después deben conjugarse con una carnitina (2) para que a través de un poro mitocondrial por difusión pasiva puedan atravesar la membrana externa mitocondrial y mediante el transportador acil-carnitina/carnitina la membrana interna mitocondrial. Dentro de la matriz mitocondrial son transesterificados a un acil-CoA para continuar el metabolismo (3). B) Una vez dentro de la matriz mitocondrial, los ácidos grasos saturados son metabolizados por β -oxidación. Este proceso genera acetil-CoA, el cual puede dirigirse al ciclo de Krebs y generar NADH que posteriormente mediante la fosforilación oxidativa forma ATP. En ciertas condiciones, el acetil-CoA puede dirigirse a la síntesis de cuerpos cetónicos.

La síntesis de cuerpos cetónicos se lleva a cabo principalmente en el hígado. Estos pueden ser exportados a otros tejidos, como el corazón o músculo esquelético, para ser utilizados como fuente energética alterna. Incluso el cerebro puede adaptar su metabolismo para utilizar D- β -hidroxibutirato o acetoacetato como molécula energética ante la falta de glucosa, por ejemplo en ayunos prolongados o en pacientes diabéticos no controlados [30]. Es interesante destacar cómo en dos condiciones opuestas, la “sobre-nutrición” por HFD y los ayunos prolongados, hay una mayor producción de cuerpos cetónicos. En ambas situaciones la síntesis de cuerpos cetónicos se puede activar dado que los ácidos grasos consumidos (provenientes de las HFD) o almacenados (en adipocitos y que se movilizan en condiciones de ayuno) se metabolizan para generar moléculas que funcionan como sustratos energéticos para los tejidos del cuerpo.

Todas estas moléculas pueden ser utilizadas en el metabolismo energético. Sin embargo, los SFA han sido sujeto de estudio en condiciones metabólicas, debido a que se debate la posibilidad de ser metabolizados por neuronas. Particularmente, el SFA de mayor abundancia en las HFD (representa el 3.3% de estos ácidos grasos) y al cual se le han atribuido la mayor parte de los cambios metabólicos, celulares y moleculares, es al AP [45, 46]. Este SFA no solo es una biomolécula energética, también tiene otros roles en la fisiología celular. Dado esto, es importante conocer a detalle los múltiples efectos que se han reportado del AP.

1.2.1 Los efectos pleiotrópicos del ácido palmítico en la célula

El AP es un SFA común en diferentes alimentos, por ejemplo: representa el 65% de los ácidos grasos de la mantequilla, 42% de la manteca, 13% del aceite de maíz y el 17% del aceite de oliva [45]. Dentro del cuerpo humano representa aproximadamente el 65% de los SFA totales y cerca de un 35% de los que se encuentran circulantes en suero. Usualmente la concentración oscila entre los 110 y 180 $\mu\text{mol/L}$ en individuos sanos. Sin embargo, se ha encontrado elevado en circulación y líquido cefalorraquídeo de pacientes con obesidad y diabetes [47–50]. Estudios epidemiológicos han determinado que condiciones derivadas del consumo de dietas ricas en AP, como sucede en la obesidad o en enfermedades como la diabetes, aumentan la probabilidad de presentar deterioro cognitivo e incluso enfermedades neurodegenerativas [51–54]. También se ha demostrado la presencia incrementada de este SFA en el cerebro de pacientes *postmortem* con la EA comparado con aquellos que no presentan marcadores de la EA [55]. Adicional a esto, en modelos murinos y cultivos de neuronas las HFD o la sola exposición de AP fomenta la aparición de marcadores bioquímicos característicos de la EA y se relacionan con un deterioro cognitivo y otras características de la neurodegeneración como la neuroinflamación [56–62]. Estos datos han posicionado el consumo excesivo de dietas ricas en SFA, como el AP, y condiciones metabólicas como un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la EA [63].

El AP puede ser ingerido, absorbido y metabolizado a través de las rutas antes descritas (Fig. 3A-B y Fig. 4) o ser sintetizado a partir de diferentes biomoléculas. Tal es el caso en el consumo excesivo de carbohidratos, donde el cuerpo ya no puede usarlos como moléculas energéticas o almacenarlos en forma de glucógeno y se promueve la síntesis de lípidos *de novo* [64]. Esta se estimula por un exceso de insulina y glucosa que induce la actividad de factores de transcripción como el factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c) y la proteína de unión al elemento sensible a los carbohidratos (chREBP), que inducen la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos [65, 66]. Aunado a esto, durante la síntesis de ácidos grasos *de novo* el AP es el precursor para poder formar ácidos grasos de cadenas más larga, generando un aumento en las concentraciones tisulares y séricas que sobrepasan las fisiológicas.

En la mayoría de las células, la utilización del AP como molécula energética a través de la β -oxidación o convertirse en reservorio de energía al ser parte de triglicéridos en los cuerpos lipídicos (Fig. 5-1), no son los únicos destinos que tiene. Cerca del 30% se utiliza como parte del metabolismo energético y entre el 60 y 70% forma parte de los fosfolípidos [67, 68]. Dado esto, es un componente estructural muy importante de las membranas celulares (Fig. 5-2). La composición de las membranas celulares es fundamental para la actividad de otras proteínas ya que permite su interacción, agregación o dispersión [69]. Además de que los mismos lípidos que la componen pueden ser modificados químicamente para actuar como mensajeros en diferentes vías de transducción de señales. Los fosfolípidos en la membrana, principalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y sus derivados, están compuestos por una molécula de AP y otro ácido graso, que a partir del AP se deacila o se reacila [70].

Por otro lado, el AP es un sustrato importante para la S-palmitoilación. Esta es una PTM reversible en donde se une covalentemente el AP a cisteínas específicas de una gran variedad de proteínas (Fig. 5-3). Dada la naturaleza reversible de la PTM, la actividad, interacción, localización y/o estabilidad de las proteínas se regula de una forma dinámica [71]. La S-palmitoilación es un regulador de la función y localización proteica. Esto debido a que aumenta la hidrofobicidad de las proteínas, facilitando su interacción y direccionamiento a vesículas o entre organelos e incrementando su afinidad por las membranas celulares y por dominios como las balsas lipídicas [72, 73]. Estos dominios de membrana son ricos en AP y actúan como regiones donde se facilita la interacción entre proteínas para iniciar cascadas de señalización [74, 75]. Se han identificado una gran cantidad de proteínas importantes para el funcionamiento neuronal que son reguladas por la S-palmitoilación. Entre estas se encuentran: BACE1,

Rodopsina, receptores de neurotransmisores, Sinaptotagmina 1/2, PSD95, Ras, entre otras más [76], por lo que la S-palmitoilación es de gran importancia para los procesos celulares y moleculares.

La síntesis de ceramidas es otro proceso bioquímico en el cual el AP es protagonista. Existen tres vías para la síntesis de ceramidas: la vía de la esfingomielinasa, la vía de rescate mediante el catabolismo completo de esfingolípidos y la vía de síntesis *de novo*. Esta última es llevada a cabo en el RE y en el primer paso, siendo el limitante de la vía, la serina C-palmitoiltransferasa (SPT) condensa una molécula de AP con una serina (Fig. 5-4) [77]. Después se llevan a cabo tres reacciones enzimáticas para poder generar la ceramida. Dado esto, un exceso de AP está asociado con una acumulación de ceramidas. Esta ceramida puede ser utilizada en el aparato de Golgi para producir esfingolípidos además de actuar como señal en otros procesos celulares como apoptosis, senescencia celular, migración celular y diferenciación. De manera interesante, se sabe que un exceso en la producción de ceramidas está asociado con resistencia a la insulina por inhibición de Akt y activación de PP2A y PKC, con la disfunción mitocondrial mediante la producción de ROS y la agregación de colesterol en las paredes arteriales [78–81]. Estudios en ratones obesos y modelos celulares de neuronas humanas demuestran que la inhibición de la síntesis de ceramidas con miriocina mejora la señalización de la leptina y disminuye la resistencia a la insulina [78, 82, 83].

Otra de las acciones fisiológicas del AP es la activación de receptores (Fig. 5-5). Tal es el caso de CD36, del receptor 1 de ácidos grasos libres (FFAR1 o GPR40) y la familia de PPAR [84, 85]. CD36 es una proteína integral de membrana que funciona como un transportador de SFA de cadena larga y de LDL oxidados en enterocitos, células endoteliales y adipocitos [85, 86]. Sin embargo, se ha detectado en neuronas de hipotálamo donde tiene un papel importante en señalización de calcio intracelular asociada con la activación de diferentes canales iónicos, como los de Cl^- y K^+ , para que, mediante cambios en el potencial de membrana se liberen neurotransmisores y neuropéptidos importantes para mantener el balance energético [87, 88]. El mecanismo propuesto es a través de la activación de la fosfolipasa C mediante la liberación de Ca^{2+} del RE al citoplasma [89, 90]. En otras regiones del cerebro, como el hipocampo y la corteza, las neuronas muestran una baja expresión de CD36 [91]. Sin embargo, recientemente se caracterizó detalladamente la expresión de CD36 en estas regiones del cerebro y se encontró un incremento a lo largo del envejecimiento en la vasculatura cerebral, sin cambios evidentes en neuronas o astrocitos [91]. Adicional a esto, estudios realizados en diferentes modelos de la EA, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observa un aumento en la cantidad de CD36 en diferentes tipos celulares, las neuronas incluidas, que es dependiente de la presencia de β -amiloide ($\text{A}\beta$) [92–94]. Estos datos sugieren que mecanismos alterados en el envejecimiento patológico del sistema nervioso central como la liberación de neurotransmisores, permeabilidad de la barrera hematoencefálica o la señalización de calcio, podrían involucrar la desregulación de CD36 y por lo tanto estar vinculados con los SFA como el AP. Otro receptor que tiene como ligandos a ácidos grasos de cadena larga, dándole la propiedad de sensor metabólico para las neuronas es el FFAR1 [95, 96]. Cuando el AP se une al FFAR1 se induce un incremento de Ca^{2+} citosólico a través de la vía de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K). En células pancreáticas, esta liberación de calcio culmina con la secreción de insulina [97]. Sin embargo, en sistema nervioso su activación con diferentes ácidos grasos se asocia con la proliferación de progenitores neurales a través de la expresión de BDNF, así como con la actividad neuronal para la ejecución de tareas de memoria y aprendizaje [98, 99]. De manera interesante, en una línea celular de neuroblastoma humano (SK-N-MC) la activación del FFAR1 con AP induce la aparición de marcadores de neurodegeneración, como el $\text{A}\beta$ [60]. Adicional a la activación del FFAR1, también es capaz de activar receptores nucleares como los PPAR, los cuales se abordarán posteriormente [100].

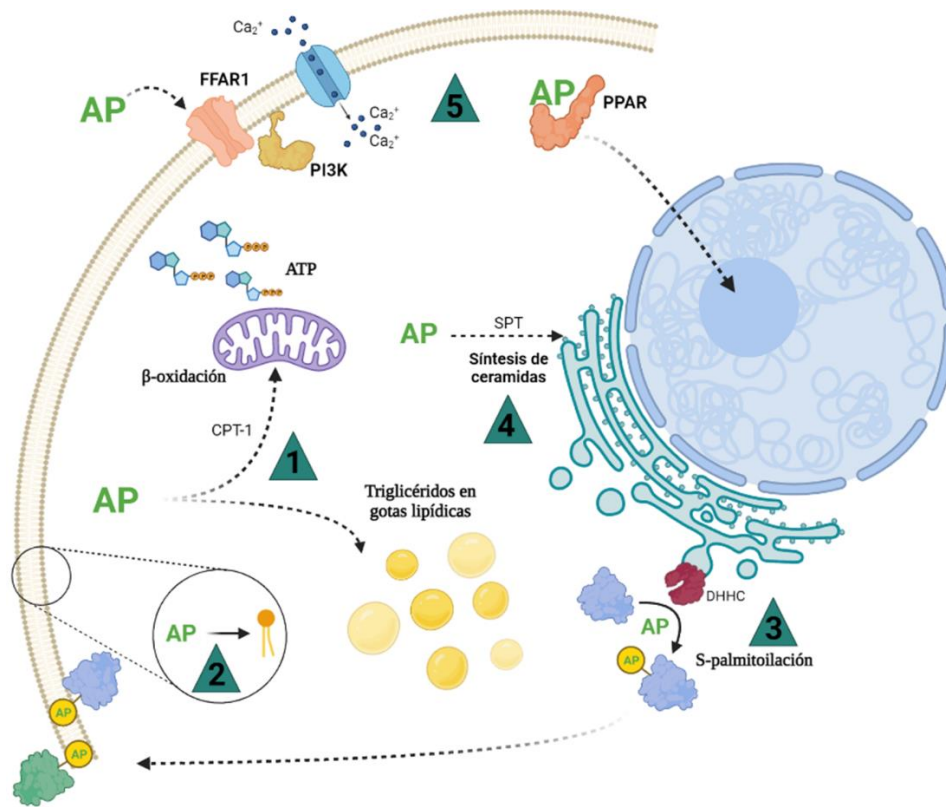


Figura 5 Procesos celulares no patológicos en los que participa el AP. Este SFA puede ser utilizado como molécula energética a través de la β -oxidación mitocondrial o almacenarse en las gotas lipídicas (1) para posteriormente ser utilizado. Además, forma parte importante de los fosfolípidos de las membranas (2). También es un sustrato para generar la S-palmitoilación de proteínas, la cual es una PTM que regula su localización, estabilidad e interacción con otras proteínas (3). Incluso, el AP, puede ser utilizado como precursor de otras moléculas como las ceramidas, las cuales son sintetizadas en el RE a través de la SPT (4). Finalmente, puede activar a receptores de membrana, como el FFAR1, o receptores nucleares dependientes de lípidos, como la familia de PPAR (5).

A pesar de que el AP tiene múltiples funciones celulares no tóxicas, el exceso en el consumo de este SFA genera una acumulación en tejidos no adiposos, el cerebro incluido. Estudios en humanos y ratones obesos han mostrado niveles incrementados de AP en el cerebro de estos individuos [50, 101]. Adicionalmente, los resultados reportados en tejidos periféricos como hígado, músculo y páncreas recapitulan muchos de los efectos observados con las HFD. Entre ellos se observan la resistencia a la insulina, estrés del RE, disfunción mitocondrial e inflamación [102–106].

Uno de los efectos deletéreos ampliamente caracterizado es la función alterada/deteriorada de organelos. Entre los organelos afectados sobresalen el RE y la mitocondria. En el RE la acumulación de AP y metabolitos de lípidos complejos genera un efecto conocido como estrés del RE [105]. Esta disfunción del RE afecta la señalización de calcio y la traducción y plegamiento de proteínas, que activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR; Fig. 6) [107]. Estos mecanismos activan a proteínas como I κ B y JNKs que, a través de factores de transcripción específicos, como p65 de la familia NF- κ B, inducen la activación de vías pro-inflamatorias y pro-apoptóticas [105, 108]. Por otro lado, el exceso de SFA también afecta la función mitocondrial. Estos no pueden ser oxidados en su totalidad por la mitocondria generando un aumento en las ROS (Fig. 6) [109, 110]. Dicho proceso desencadena una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, daño al DNA mitocondrial, aumento en la actividad de JNK y finalmente apoptosis [110–112].

Otro mecanismo que cada vez se caracteriza de una mejor forma es la inflamación que induce el AP (Fig. 6). De manera interesante, diferentes mecanismos convergen en la activación de vías de señalización propias de la inflamación como JNKs, NF- κ B o el inflamasoma NLRP3. El incremento en la síntesis de ceramidas puede activar directamente a NLRP3 y, a través de DAG, a la proteína cinasa C (PKC) para que después esta active a IKK β [113–115]. Esta última es una proteína que al ser activada fosforila a I κ B, promoviendo su degradación para que se active el heterodímero p65-p50. La activación de estos factores de transcripción, pertenecientes a la familia de NF- κ B, inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-6, TNF α , pro-IL-1 β , entre otras citocinas [116–118]. Por otro lado, el estrés de RE genera un aumento en la actividad de JNK, un regulador positivo de la vía de NF- κ B y por lo tanto de citocinas pro-inflamatorias [117, 119, 120]. Otro mecanismo propuesto es a través de la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4). La interacción del AP con el TLR4 no es directa, es necesaria la presencia de la Fetuina A [121]. Esta glicoproteína es secretada por las células β -pancreáticas en respuesta a un exceso de SFA circulantes [122]. Cuando el AP se une a la Fetuina A aumenta su interacción con el TLR4, activando la vía de señalización de NF- κ B, que al final induce la transcripción de genes pro-inflamatorios a través de la actividad de p65 [123, 124].

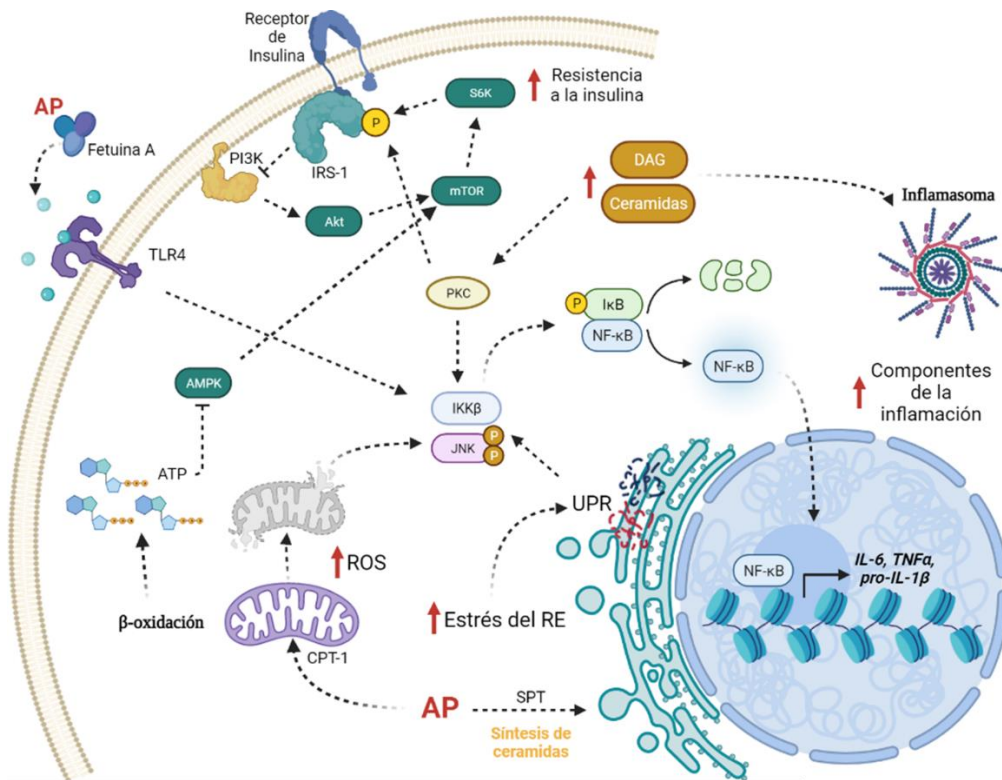


Figura 6 Efectos nocivos del consumo excesivo y acumulación en tejido no adiposo del AP. Entre los efectos descritos se encuentra el estrés del RE, generado por la acumulación de ceramidas y sus precursores que pueden desencadenar múltiples respuestas como la UPR y activar a componentes de la inflamación. Incluso a través del DAG, se puede generar resistencia a la insulina por activación de PKC, que fosforilan al IRS-1 en serinas inhibitorias. También se ha observado el aumento de ROS que daña la membrana mitocondrial y activa a vías como la de JNK. La inflamación es un componente que el AP activa a través de diferentes mecanismos como el estrés del RE, el TLR4 o el aumento en la producción de ceramidas y DAG, que culmina en la transcripción de genes proinflamatorios. Finalmente, la resistencia a la insulina es un efecto ampliamente reportado que se da por sobreactivación de mTOR y S6K a través de la inhibición de AMPK o por la disregulación de la misma vía dependiente de Akt.

Respecto al metabolismo energético, la resistencia a la insulina es una de las alteraciones más estudiadas en tejidos periféricos ante la exposición de AP. Sin embargo, los mecanismos por los cuales esto sucede recientemente se han comenzado a esclarecer, incluyendo aquellos en el sistema nervioso central. La síntesis exacerbada de lípidos complejos es uno de los mecanismos por los cuales sucede, ya

que si se bloquean las enzimas que participan en este proceso, se pueden evitar los efectos observados en la señalización de la insulina [78, 125–128]. A través de la síntesis de ceramidas se activan isoformas de PKC, como la PKC θ o PKC ϵ [129–131]. Estas isoformas fosforilan al sustrato del receptor a insulina 1 (IRS-1) en serinas inhibitorias, atenuando la señalización de la insulina [113, 128, 129]. Por otro lado, la fosforilación de serinas de IRS-1 a través de la vía mTOR/S6K contribuye a la resistencia a la insulina. En esta vía la activación de la cinasa S6K, río abajo de mTOR, inhibe al IRS-1 atenuando la señalización (Fig. 6) [132–134]. Adicionalmente, IRS-1 puede ser inhibido a través del aumento en el ATP (disminución de AMP) [135] generado por la β -oxidación del AP. Esto debido a que se inhibe la cinasa dependiente de AMP (AMPK), lo que permite que mTOR y S6K continúen activas [135, 136], contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina. Otro mecanismo relacionado a esta alteración es la activación de PP2A que puede inhibir la vía de señalización a través de la desfosforilación de Akt [137]. Adicional a esta fosfatasa, que al desfosforilar ejerce su función, Tribbles 3 inhibe a Akt por unión directa [138]. Se ha demostrado que en hepatocitos esta proteína aumenta sus niveles cuando hay estrés del RE por exposición a AP [139], lo que también contribuye a la resistencia a la insulina.

1.2.2 Mecanismos neuronales afectados por las HFD y su relación con la neurodegeneración

Adicional a los mecanismos mencionados, el consumo excesivo de AP altera la actividad de proteínas importantes para el metabolismo energético celular y que regulan de manera negativa la inflamación, tal es el caso de SIRT1 y PPAR γ [140–142]. Ambas proteínas pueden ser reguladas por componentes del metabolismo energético y a su vez, regulan la expresión de genes a través de factores de transcripción.

SIRT1 es una desacetilasa de histona (HDAC) clase III dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD $^+$) [143, 144]. En la reacción enzimática se cataliza la desacetilación de proteínas mediante la hidrólisis de NAD $^+$ y se transfiere el grupo acetilo de la lisina a la posición 2'-OH de la ADP-ribosa, generando una proteína con lisinas descetiladas, 2'-O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida [145, 146]. A través de su actividad enzimática, SIRT1 regula a una gran cantidad de proteínas citoplasmáticas y nucleares, como los factores de transcripción. Entre sus blancos se encuentran p53, miembros de la familia FOXO, p65, PGC-1 α y miembros de la familia de PPAR [144, 147]. Dada esta gran variedad de sustratos, Sirt1 está involucrada en múltiples procesos celulares como metabolismo, inflamación, supervivencia celular y senescencia [144, 147, 148].

Inicialmente, SIRT1 se caracterizó como un regulador positivo de la longevidad, ya que al sobre-expresar a esta HDAC se observa un aumento en la expectativa de vida de diferentes organismos, siendo *S. cerevisiae* el primer modelo donde se reportó este efecto [149, 150]. En esta levadura, Sir2 (homólogo de SIRT1) regula los círculos extracromosómicos de DNA ribosomal (rDNA). Estos fragmentos de DNA están involucrados en la replicación de la levadura; cuando hay una acumulación de 500 a 1000 de los rDNA en el nucleolo, la levadura se deja de dividir [149, 151, 152]. Sin embargo, cuando se inserta 1 copia extra del gen de *SIR2* hay un silenciamiento de la región rDNA que suprime su formación y por lo tanto la acumulación, lo que permite que la levadura tenga mayor número de divisiones/longevidad que aquella que no tiene la copia extra [151]. En mamíferos, el efecto en la longevidad mediado por SIRT1 se ha relacionado con mecanismos de protección contra el acortamiento de los telómeros y el rescate de la senescencia celular prematura a través del sistema p53, daño al DNA y los cuerpos nucleares de proteínas de la leucemia promielocítica [152, 153]. Sin embargo, se hipotetiza que SIRT1 podría impactar en la longevidad a través del metabolismo energético.

Como toda enzima, la actividad catalítica de SIRT1 depende del sustrato y la coenzima (también llamada cosustrato): la proteína acetilada y el contenido intracelular de NAD $^+$. El NAD $^+$ es mejor conocido por su papel como cofactor dentro de las reacciones de reducción-oxidación (redox) celulares. Sin

embargo, dentro de la clasificación bioquímica de los cofactores, las coenzimas se pueden nombrar dependiendo del tipo de unión que tienen con la enzima, unión covalente o una unión transitoria. Aquellas coenzimas que se unen de forma covalente se denominan grupos prostéticos mientras que las que se unen de forma transitoria, como el NAD⁺, se les denomina cosustratos [30, 154]. Esto debido a que el NAD⁺ es enzimáticamente procesado junto con el sustrato principal generando moléculas diferentes a las iniciales [155–158]. En las reacciones redox, el NAD⁺ acepta electrones para formar NADH, el cual cede los electrones aceptados, principalmente a la fosforilación oxidativa mitocondrial, para regenerar el NAD⁺. Esta propiedad única de ambas moléculas permite que el NAD⁺ sea una molécula clave en el metabolismo energético, reflejando los niveles energéticos celulares mediante el contenido de sus dos formas: NAD⁺ y NADH [155]. Se ha reportado que las HFD y los ácidos grasos afectan la cantidad de NAD⁺ disponible en las pozas celulares [159]. Esta cantidad tiene una estrecha relación con la actividad enzimática de SIRT1 [160–162]. Tomando esto en cuenta, niveles altos de NAD⁺ (bajos niveles energéticos) favorece la actividad enzimática, mientras que niveles bajos de NAD⁺ disminuyen su actividad. Por lo tanto, cualquier condición que afecte el metabolismo energético, impacta en el balance del índice NAD⁺/NADH y en las funciones de SIRT1.

En diferentes modelos celulares y animales, se ha observado que condiciones donde hay bajos niveles energéticos, como en la CR, ayuno o ejercicio, la actividad y expresión de SIRT1 está aumentada [15, 163–166]. De manera interesante, en ratones transgénicos que sobre-expresan a SIRT1 se ha reportado un fenotipo parecido a aquellos observados con CR [166]. Por otra parte, la delección de *Sirt1* en ratones evita que algunos de los efectos de la CR se observen, principalmente el aumento en la longevidad y además se desencadenan procesos inflamatorios, acumulación de lípidos y estrés del RE [167]. Otro efecto reportado de la CR es el incremento en los niveles proteicos de SIRT1 en diferentes tejidos, el cerebro incluido [168, 169]. Mientras que la exposición a HFD o a diferentes ácidos grasos no solo modula la actividad de SIRT1 a la baja, sino también su expresión [146, 170]. Adicional a esto, los niveles y actividad de SIRT1 se han encontrado disminuidos en el cerebro de pacientes *postmortem* con la EA [171]. También se ha reportado que la activación de SIRT1 mediante métodos farmacológicos mejora la sensibilidad a la insulina y aumenta el metabolismo energético [172]. Estos resultados sugieren que la posible inhibición de SIRT1 por el consumo de HFD podría deberse a una disminución en el índice NAD⁺/NADH derivado de la presencia y alto contenido de SFA como el AP.

Por otro lado, la familia de PPAR son receptores nucleares hormonales que interactúan con otros factores de transcripción, coreguladores y reconocen secuencias específicas de DNA [173]. En los miembros de esta familia se incluyen PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , y se encuentran expresados en los diferentes tejidos del cuerpo humano, particularmente en aquellos con alta tasa metabólica [173, 174]. Los PPAR responden directamente a lípidos y sus derivados regulando principalmente la biogénesis mitocondrial, el metabolismo de lípidos y el metabolismo energético. A nivel de sistema nervioso central, la activación de las diferentes isoformas de los PPAR se ha asociado con efectos neuroprotectores y antiinflamatorios [84, 174–178]. Entre los mecanismos caracterizados se encuentran la inhibición de procesos inflamatorios mediante un *crossstalk* con p65 y el inflammasoma y la reducción en la transcripción de genes involucrados con marcadores de neurodegeneración, como *Bace1* [16, 179, 180]. En modelos de ratones transgénicos para la EA se ha observado que el uso de agonistas de PPAR γ tiene múltiples efectos como la reducción de la deposición de A β , en la producción de citocinas proinflamatorias así como en la activación de astrocitos y microglía, todo esto también asociado a una prevención del deterioro cognitivo observado en estos modelos [16, 177, 181]. Además, estos datos sugieren fuertemente una regulación de procesos inflamatorios a través de estos receptores nucleares. En cultivos celulares hipocámpales se ha observado que PPAR puede proteger contra la citotoxicidad inducida por A β , por una disminución en la expresión de *Bace1* mediante la unión a su promotor y una inhibición directa de p65 [16, 182, 183]. Adicional a esto, se conoce que SIRT1 regula a otros miembros de la familia de PPAR. En una línea celular

de hígado, una sobreexpresión de SIRT1 conlleva a una mayor expresión de PPAR α que resulta en un aumento del metabolismo energético oxidativo y una mejora en el metabolismo de lípidos [184, 185].

De manera interesante, el metabolismo energético está ligado con la respuesta inflamatoria a través de estas proteínas. La inflamación es un proceso que se ha visto implicado en una gran cantidad de patologías como las enfermedades metabólicas y las neurodegenerativas. SIRT1 y PPAR γ pueden regular las respuestas inflamatorias a través de su interacción con p65. SIRT1 desacetila la lisina 310 (K310) de p65, inhibiendo su translocación nuclear. Además, esto permite la recaptura de p65 por I κ B α en el citoplasma, evitando que funcione como factor de transcripción [186–188]. Por otro lado, PPAR γ ejerce un mecanismo de transrepresión en genes pro-inflamatorios. Esto sucede mediante una unión directa a los factores de transcripción involucrados en la activación de estos genes, como p65 [189, 190]. Este tipo de unión secuestra a los factores de transcripción evitando que se ejerzan su función. Estos datos sugieren que ciertos procesos inflamatorios dependientes de p65 y que están implicados en mecanismos de neurodegeneración pueden ser modulados por proteínas que responden ante componentes del metabolismo energético.

1.2.3 Metabolismo del AP en neuronas

A pesar de que se han descrito las rutas bioquímicas por las cuales el AP podría modificar el metabolismo energético, hasta la fecha se conoce muy poco sobre los efectos del AP en neuronas en este sentido. Esto se debe en parte a que se debate el paso de ácidos grasos a través de la BHE y el tipo de metabolismo que podrían seguir este SFA en neuronas, particularmente si es posible su oxidación en mitocondrias neurales [191].

Se ha reportado que la respuesta metabólica por parte de las neuronas ante la exposición a ácidos grasos es escasa [192], ya que el metabolismo energético neuronal depende de la oxidación de glucosa y los astrocitos son las principales células que oxidan a los ácidos grasos [193]. Sin embargo, estudios recientes muestran que las neuronas pueden utilizar ambas moléculas para la producción de ATP [194]. Respecto a esto, existen estudios con neuronas hipotalámicas que demuestran que son capaces de sensor y metabolizar ácidos grasos de cadena larga para producir ATP mediante la β -oxidación mitocondrial. Este incremento en el ATP permite que los canales de potasio ATP dependientes se cierren, provocando la despolarización de neuronas hipotalámicas involucradas en la regulación del balance energético sistémico [195]. En estudios realizados en el laboratorio en una línea celular de neuroblastoma diferenciado a neurona humana, el AP indujo resistencia a la insulina y una reducción en el índice NAD⁺/NADH [134]. Adicional a esto, en este mismo modelo la exposición al AP incrementa los niveles de ATP dependiente de la β -oxidación [83]. Estos datos sugieren que las neuronas pueden metabolizar ácidos grasos ante condiciones específicas, como altas concentraciones circulantes de AP, para regular procesos neuronales.

El cerebro es uno de los órganos que es altamente susceptible al tipo de nutrientes ingeridos, debido a la gran demanda energética que requiere para realizar sus funciones. Respecto a esto, se ha propuesto que el metabolismo energético a través de proteínas como SIRT1 juega un papel importante en diferentes modelos de neurodegeneración [196–198]. SIRT1 se expresa de manera diferencial en las regiones del sistema nervioso central, sugiriendo un papel importante en la regulación de las funciones específicas de cada estructura [199, 200]. Particularmente, entre las regiones con mayor expresión se encuentran los diferentes núcleos del hipotálamo, el cerebelo, el núcleo del tracto solitario y el hipocampo [168]; este último muy demandante a nivel energético por ser altamente plástico ya que está implicado en procesos de memoria y aprendizaje.

Diferentes grupos han observado que las HFD y el exceso de AP genera alteraciones en la vía de señalización de insulina cerebral, cambios morfológicos en estructuras relacionadas con memoria y

aprendizaje como el hipocampo, disminución en marcadores sinápticos y la aparición de marcadores de envejecimiento patológico como los de la EA [1, 57, 201]. Uno de los marcadores histopatológicos de la EA es la acumulación de agregados extracelulares de A β (Fig. 7) [202]. Estos agregados se generan por un procesamiento alternativo de la proteína precursora del amiloide (APP). El metabolismo predominante (no amiloidogénico) es iniciado por la α -secretasa, ADAM10, que mediante proteólisis genera dos fragmentos a partir de la APP [203]. Después el complejo de la γ -secretasa, formada por Presenilia-1 y 2, Nicastrina y APH-1, realiza otra proteólisis liberando dos fragmentos: sAPP α y AICD [204]. El procesamiento alternativo (amiloidogénico) está activo de manera fisiológica, pero en mucho menor grado que el no amiloidogénico. Este es iniciado por la β -secretasa, BACE1, que genera dos fragmentos: sAPP β y C99 [205]. El fragmento C99 es escindido por el complejo de la γ -secretasa, formando AICD y los fragmentos A β ₍₄₀₋₄₂₎. Estos fragmentos se generan en el espacio extracelular y al ser poco solubles, se van oligomerizando hasta formar los agregados o placas amiloides [202, 204].

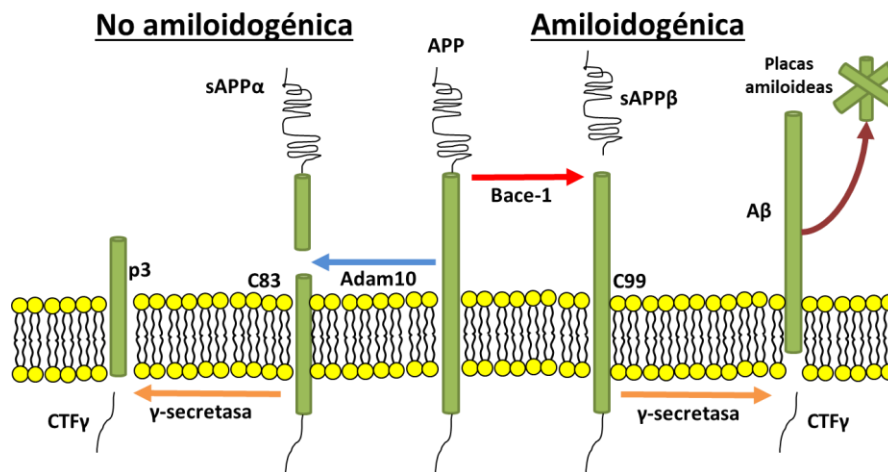


Figura 7 Procesamientos de la APP. La vía no amiloidogénica comienza con una proteólisis llevada a cabo por la α -secretasa ADAM10 mientras que la vía amiloidogénica inicia por la β -secretasa BACE1. En ambos procesamientos participa el complejo de la γ -secretasa. Sin embargo, la vía no amiloidogénica genera péptidos solubles neurotróficos, mientras que el procesamiento amiloidogénico produce péptidos no solubles (A β) que se agregan formando las placas amiloides características de la EA.

Estudios realizados por Wang *et al.* en un modelo transgénico para la EA (Tg2576), muestran que la CR disminuye el desarrollo de marcadores de la EA dependiente de la deposición de A β [206]. En diferentes modelos de cultivos neuronales, han observado que la activación farmacológica o sobre-expresión de SIRT1 promueve la expresión y actividad de ADAM10, favoreciendo el procesamiento no amiloidogénico de la APP [206–209]. Por otro lado, se ha observado en otros modelos animales sometidos a una HFD que se exacerba la cantidad de placas amiloides [57, 210–212]. Este efecto podría deberse a la relación inversa entre la actividad de SIRT1 y la expresión de BACE1, que aumentaría la producción de A β [59, 213, 214].

Las condiciones de estrés metabólico que afectan a SIRT1 también tienen efectos en la acumulación de la proteína Tau en su forma hiperfosforilada [1, 201, 215]. Esta proteína forma parte importante de las marañas neurofibrilares observadas al interior de las neuronas en la EA. SIRT1, al desacetilar a Tau, permite su ubiquitinación y por lo tanto degradación vía proteosoma [216]. Sin embargo, en modelos animales y cultivos de neuronas primarias una inhibición de SIRT1 o condiciones de estrés metabólico aumentan la acetilación de Tau, evitando la ubiquitinación y permitiendo que haya Tau disponible para hiperfosforilarse [216–218].

Estos datos sugieren fuertemente que el AP puede activar procesos de envejecimiento patológico asociados a enfermedades neurodegenerativas, a través de mecanismos que involucran el metabolismo

energético [51–55, 63]. En esto se ven implicadas proteínas que responden a la presencia de lípidos de forma directa, como es el caso de PPAR γ , o indirecta, como es el caso de SIRT1. Ambas proteínas juegan un papel importante en la regulación de la transcripción de genes implicados en múltiples procesos. Sin embargo, hasta la fecha, se conoce poco sobre cómo la célula integra todos estos mecanismos por los cuales el AP la impacta y los análisis de transcriptoma mediante secuenciación de RNA (RNAseq) podrían resolver esta pregunta, ya que al ser una técnica de análisis masiva puede proveer información sobre todos los procesos que se inhiben o activan en respuesta al AP.

1.3 Integración de los efectos de las HFD y el AP a través del transcriptoma.

Como se ha descrito, tanto las HFD como el AP tienen efectos en las células a través de múltiples mecanismos. Hasta hace algunos años se comenzaron a abordar los efectos desde una perspectiva transcriptómica. Un estudio realizado por Wang y colaboradores en el tejido adiposo de ratones muestra que tras ser alimentados con HFD se activan vías de lipogénesis, metabolismo energético e inflamación mediante mecanismos epigenéticos [219]. Particularmente, en este estudio hacen énfasis en la importancia de la vía de MAPK como un mediador entre la inflamación y el metabolismo energético. En otro estudio en ratones, los cuales fueron alimentados con HFD, se analizó el transcriptoma del hígado y se reportan resultados similares que en el tejido adiposo del modelo anterior. El metabolismo energético (evidenciado por la glucólisis y la gluconeogénesis), vías de inflamación (como IL-17, NF- κ B y MAPK) y vías de señalización y metabolismo de lípidos (vía de PPAR y la degradación de lípidos) se desregulan y se asocian con la resistencia a insulina y diabetes inducida con la HFD el modelo murino [220].

Por otro lado, en un estudio de secuenciación de célula única (*Single-cell RNAseq*) de hepatocitos de ratones que fueron sometidos a HFD, se observó que el transcriptoma cambia dependiendo de la zona del hígado de dónde se extraigan. De manera general se reportan cambios en procesos como el catabolismo de lípidos, la oxidación de ácidos grasos mediante β -oxidación, la acumulación de gotas lipídicas, la vía de señalización de PPAR, la síntesis de cuerpos cetónicos, en la vía de señalización de la insulina y algunas vías relacionadas con el metabolismo de la glucosa [221]. Estos estudios demuestran que el consumo de las HFD altera el transcriptoma de las células de diferentes tejidos y que se activan mecanismos similares, asociados al metabolismo energético y procesos inflamatorios.

Respecto a los cambios en el transcriptoma de las células del sistema nervioso central inducidos por las HFD, Yoon *et al.* utilizaron la corteza cerebral de ratones sometidos a este tipo de dietas, para caracterizarlos. Este grupo reporta la activación de vías inflamatorias y de lípidos como la de PPAR y MAPK, así como la disminución en procesos asociados a actividad neuronal. Sin embargo, en este estudio no se puede diferenciar el tipo de células que más contribuyen a los cambios transcripcionales observados [24]. De manera interesante, el estudio del transcriptoma de ratones transgénicos para la EA sometidos a HFD, además de mostrar nuevamente la activación de mecanismos asociados a la inflamación y aumento en la deposición de placas A β , muestra que procesos asociados a la memoria y aprendizaje, como la transmisión sináptica, morfología de neuritas y potenciación a largo plazo (LTP), se encuentran disminuidos mientras que la pérdida y muerte neuronal están aumentados [222]. Los datos de ambos grupos sugieren que existe una conexión entre el consumo de HFD y procesos asociados a inflamación y envejecimiento patológico del sistema nervioso central y neurodegeneración.

Los estudios transcriptómicos evalúan el efecto de las HFD y no de sus componentes por sí solos. Esta distinción es importante para conocer la contribución de los componentes ante los cambios observados con el consumo de las HFD. Algunos grupos han reportado el efecto del AP a nivel transcriptómico en modelos celulares de tejido periférico y se replican algunos de los resultados obtenidos con las HFD. En un estudio en cultivos de hepatocitos humanos expuestos a AP, se encontró una alteración en genes asociados a transporte lipídico, lipogénesis, crecimiento de gotas lipídicas, metabolismo de

glucosa y ácidos grasos [223]. Resultados similares se encontraron en cultivos primarios de islotes pancreáticos humanos expuestos a dosis no tóxicas de AP, donde genes relacionados al metabolismo de la glucosa y los lípidos se encuentran sobre-expresados [224]. Otro grupo reportó los efectos del AP en el transcriptoma de una línea celular de mioblastos donde el AP produjo la activación de múltiples procesos celulares donde participan citocinas, así como en la apoptosis y en la vía de señalización de la insulina/PI3K [225].

Finalmente, existe un trabajo sobre el transcriptoma de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo cuando los ratones son expuestos a HFD. En este, Peng *et al.* reportan una activación en vías de inflamación y del metabolismo de lípidos [226]. A pesar de que este trabajo en neuronas empieza a esclarecer cómo podría ser la respuesta transcriptómica para integrar los efectos de las HFD, es de suma importancia caracterizar qué tanto la respuesta de neuronas ante la exposición a SFA, como el AP, replica lo observado por las HFD y cómo se afecta el transcriptoma de neuronas que no pertenecen a estructuras involucradas en la regulación del metabolismo periférico y que son afectadas en gran medida por enfermedades neurodegenerativas. Todo esto considerando la gran asociación que existe entre las condiciones metabólicas, como resistencia a la insulina y diabetes como factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, como la EA.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de dietas ricas en SFA se ha asociado al deterioro cognitivo y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a que el cerebro es altamente sensible a cambios en el metabolismo energético. No obstante, hasta la fecha se conoce muy poco sobre cómo ciertos componentes de estas dietas, como el AP, altera los procesos moleculares y celulares de las neuronas. Por lo tanto, dados los efectos pleiotrópicos de este ácido graso en tejidos periféricos, es importante caracterizar la respuesta metabólica y los cambios en el transcriptoma neuronal que nos acerquen a comprender mejor cuáles alteraciones neuronales pueden llevar a un envejecimiento patológico y contribuir al desarrollo de enfermedades degenerativas, como la EA.

Preguntas de investigación:

¿Cuál es la respuesta metabólica, transcriptómica y celular de neuronas hipocampales expuestas a una concentración elevada de AP?

¿Cómo contribuye lo anterior a la expresión de marcadores bioquímicos de EA?

3. HIPÓTESIS

La exposición a concentraciones altas no citotóxicas del AP modifica el metabolismo energético neuronal, e induce la expresión diferencial de genes asociados con vías del metabolismo lipídico, inflamatorias y de procesos asociados a envejecimiento patológico y neurodegeneración.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los cambios en el metabolismo energético neuronal, en la expresión de marcadores de la EA y en el transcriptoma ante una exposición a AP.

4.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar los cambios metabólicos en neuronas de hipocampo después de la exposición a AP analizando componentes del metabolismo energético.
2. Estudiar las modificaciones en la expresión, actividad y localización de Bace1 como resultado de la exposición neuronal al AP.
3. Caracterizar el efecto del AP sobre el perfil transcripcional de las neuronas hipocampales y la repercusión en los procesos celulares de los genes diferencialmente expresados.
4. Validar los cambios en la expresión de algunos de los genes implicados en los procesos biológicos identificados.
5. Proponer el mecanismo a través del cual el AP compromete la funcionalidad neuronal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo experimental utilizado fue cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Todos los experimentos se realizaron a los 12 días *in vitro* (DIV). A continuación, se muestra un esquema del diseño experimental general.

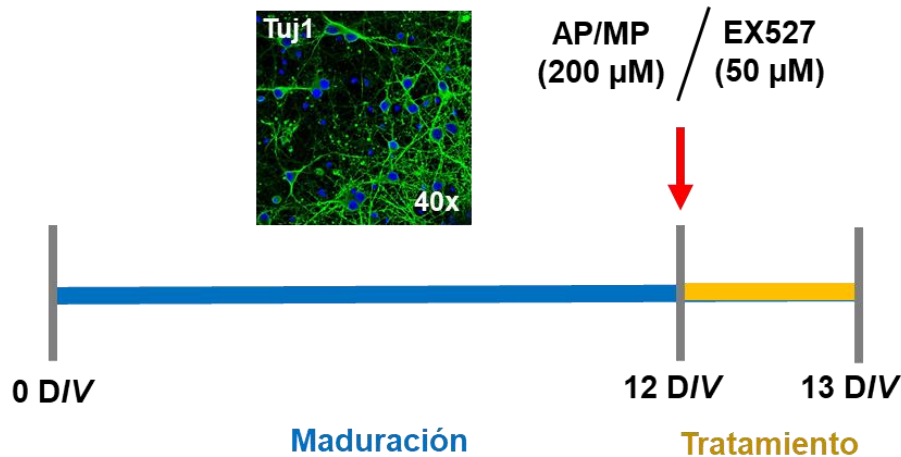


Figura 8 Diseño experimental. Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo (inmunodetección de Tuj1 como marcador de neuronas maduras) cultivados por 12 días sin cambio de medio. A los 12 DIV se les agregaron diferentes compuestos: AP, MP o EX527. 24 horas después de los tratamientos con AP o MP o 12 horas después del tratamiento con EX257, los cultivos se extrajeron para realizar los diferentes experimentos.

5.1 Cultivo celular

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron obtenidos a partir de embriones de rata Wistar entre los días 16 a 18 de gestación. Todos los animales se manejaron con el cuidado establecido según las normas y reglamentos para evitar el sufrimiento establecidas por la Comisión Nacional de Bioética de México y con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, protocolo de ética No. 171). Una vez que se sacrificó a la rata gestante por decapitación y se extrajo a los embriones del útero, se decapitaron con tijera y se obtuvo el cerebro. Estos se colocaron en una caja Petri con solución #1 y, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se realizó la disección de los hipocampos manteniéndolos en todo momento en la solución #1. Finalmente, se “limpió” el hipocampo para eliminar los restos de meninges, se transfirieron a una caja Petri y se procedió a la obtención de la suspensión celular de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Retirar solución Krebs (solución #1) teniendo cuidado de no aspirar el tejido.
2. Triturar el tejido con una navaja de bisturí hasta disgregar lo mejor posible.
3. Tomar 1 mL de la solución #1 y lavar el tejido. Aspirar solución junto con tejido y depositarlo en 9 mL de la solución #1 contenidos en un tubo Falcon de 15 mL. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto para sedimentar todo el tejido.
4. Aspirar todo el volumen posible de la solución #1 sin deshacer el pellet. Agregar 7 mL de la solución #2 (previamente calentada a 37°C). Deshacer el pellet suavemente por inversión. Calentar a 37 °C por 10 minutos para que actúe la tripsina.
5. Agregar 7 mL de la solución #4 y permitir que durante 5 minutos se detenga la reacción de tripsinización y que la DNAsa I digiera el DNA que se ha liberado. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto.

6. Agregar a un vaso de precipitados con el tamiz (Cell Strainer Corning®, 40 µM Nylon, REF. 431750) 5 mL de la solución #3.
7. Aspirar sobrenadante sin disgregar el pellet. Agregar 1 mL de la solución #3 (tomar del vaso de precipitados con el tamiz) y resuspender el pellet apoyando la punta de la pipeta contra la pared del tubo Falcon para disgregar los cúmulos de células formados cuidadosamente.
8. Aspirar el tejido disgregado y colocarlo de regreso en el vaso de precipitados con el tamiz y la solución #3. Resuspender varias veces para generar una suspensión celular homogénea con ayuda del tamiz.
9. Tomar toda la solución #3 del vaso de precipitados y tamiz (por fuera del tamiz) que ahora contiene la suspensión celular y pasarla a un tubo Falcon nuevo con 5 mL de la solución #5. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
10. Aspirar todo el sobrenadante y resuspender en el volumen de medio deseado para realizar conteo celular y poder realizar la siembra.

Se sembraron las neuronas en cajas de 12 pozos a una densidad de 1 millón de células por pozo y en cajas Petri de 60 mm x 15 mm a una densidad de 6 millones de células por caja. Las cajas se incubaron previamente con poli-L-lisina (10 µg/mL en PBS estéril) a 37 °C durante 2 a 24 horas. Las neuronas en cultivo se mantuvieron con medio de cultivo Neurobasal (Gibco #21103049) suplementado con 2% B27 (Gibco #17504044), 0.5 mM L-Glutamina (Gibco #25030081) y 20 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco #15140122). A los 3 D/IV se les agregó arabinósido de citosina (Sigma #C1768) a una concentración final de 10 µM para inhibir la proliferación de células no neuronales. Previamente se ha determinado que la población de astrocitos en estos cultivos es menor al 5%, medido por inmunofluorescencia contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (datos no mostrados). Las neuronas se mantuvieron por 12 D/IV a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂/95% aire.

5.1.1 Soluciones necesarias para realizar el cultivo primario de neuronas

Las cantidades de las soluciones son para realizar el cultivo neuronal a partir de 5 a 7 embriones.

Tabla 1 Soluciones para realizar el cultivo primario de neuronas de hipocampo.

<u>Para 50 mL de Solución Krebs (10x)</u> 1.21 M - 3.585 g NaCl 0.0048 M - 0.18 g KCl 0.0122 M - 0.082 g KH ₂ PO ₄ 0.254 M - 1.07 g NaHCO ₃ 0.142 M - 1.285 g Glucosa 0.00042 M - 0.0075 g Rojo Fenol	<u>Solución #1</u> 10 mL Solución Krebs 10x 90 mL Agua destilada estéril 300 mg BSA 800 µL MgSO ₄ 3.8% 300 µL Penicilina/Estreptomicina
<u>Solución #2</u> 10 mL Solución #1 2.0 mg Tripsina (Sigma #T9201-1G)	<u>Solución #3</u> 10 mL Solución #1 5.2 mg Inhibidor SBT (Gibco #17075-029) 100 µL MgSO ₄ 3.8% 0.8 mg DNAsa I (Sigma #TD5025-150KU)
<u>Solución #4</u> 10.5 mL Solución #1 2 mL Solución #3	<u>Solución #5</u> 10 mL solución #1 12 µL CaCl ₂ 1.2% 800 µL MgSO ₄ 3.8%

5.2 Tratamiento de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo

A los 12 D/V los cultivos neuronales fueron tratados con diferentes dosis de AP (Sigma #P0500-10G), con metilpalmitato (Sigma #P5177-5G) o EX527 (Sigma #E7034-5mg). El AP y el metilpalmitato (MP) se prepararon al momento de ser utilizados a una concentración de 200 mM en 100% etanol. Después se hizo una dilución (5 mM) tomando 12.5 μ L del stock 200 mM en 500 μ L de PBS/BSA 10%, se incubó a 37 °C por lo menos 2 horas hasta disolverse (conjugación del AP o MP con la albúmina). Con este conjugado de ácido graso/BSA se realizaron los tratamientos. Para el AP, las concentraciones finales en el cultivo fueron de 100 hasta 300 μ M para los ensayos de MTT y 200 μ M para el resto de los experimentos; para el MP se utilizó una concentración de 200 μ M final en los cultivos. El vehículo PBS/BSA 10% fue utilizado como condición control en todos los experimentos y el BSA tuvo una concentración final en el cultivo de 0.4%. El EX527 se preparó con dimetilsulfóxido (DMSO; concentración final en cultivo de 0.01%) y se dejó equilibrar a temperatura ambiente por lo menos 1 hora previa a su aplicación a los cultivos. La concentración final en cultivo utilizada del EX527 fue de 50 μ M y se trataron las neuronas por un periodo de 12 horas.

5.3 Ensayo de actividad oxido-reductora mitocondrial (reducción de MTT)

Los cultivos celulares se incubaron con 100, 150, 200 ó 300 μ M de AP a los 12 D/V. 24 horas después se les agregó sales de tetrazolio MTT (solución *stock*: 5 mg/mL en PBS estéril) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 800 μ L de isopropanol ácido (19.2 mL isopropanol con 0.8 mL HCl 1N) para disolver los cristales de formazan. Se tomaron 2 alícuotas de 200 μ L de cada pozo, se colocaron en una placa de 96 pozos y se leyeron en un espectrofotómetro a 570 nm.

5.4 Cuantificación del consumo de glucosa

La concentración de glucosa a lo largo de los D/V del cultivo neuronal y antes y después del tratamiento con AP y MP se obtuvo con el sistema Accu-Chek de Roche. Para evitar la interferencia con las lecturas, se utilizó el Neurobasal sin Rojo Fenol. 1 μ L del medio de cultivo se colocó en la tira reactiva del sistema Accu-Chek para la cuantificación. Las mediciones se hicieron por triplicado técnico y quintuplicado biológico.

5.5 Cuantificación de la relación NAD⁺/NADH

Para cuantificar la relación NAD⁺/NADH se utilizó un kit colorimétrico de Abcam (#ab65348). Después de 24 horas del tratamiento con AP o MP (200 μ M) se les retiró el medio de cultivo y se siguieron las instrucciones para aislar el NAD⁺ y el NADH, de acuerdo con el fabricante. Brevemente, los cultivos neuronales se lavaron una vez con PBS frío. Se desechó el PBS y se agregaron 400 μ L del Buffer de extracción de NAD⁺/NADH en la misma caja de cultivo en que fueron sembradas las neuronas. Se hicieron dos ciclos de congelamiento/descongelamiento (20 minutos en hielo seco seguido de 10 minutos a temperatura ambiente). Se transfirió la muestra a tubos Eppendorff, se agitaron en vórtex por 10 segundos y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos manteniéndolos en hielo. Se tomó una alícuota de 200 μ L en un tubo nuevo para calentarla a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se preparó la curva estándar como indica el proveedor y se hicieron diluciones de las muestras para realizar las lecturas en placas de ELISA. Se les agregó 100 μ L del mix de enzima NAD cicladora (incluida en el kit, basada en la reacción enzimática de amplificación de la NAD sintasa y la alcohol deshidrogenasa [227]) a cada pozo. Se dejó la reacción por 5 minutos. Se agregaron 10 μ L de la solución reveladora y se dejó incubar de 30 a 90 minutos para su lectura a 450 nm en un espectrofotómetro. Cada lectura de la muestra se hizo por duplicado.

5.6 Cuantificación de la tinción de Rojo Oleoso O

La detección de cuerpos lipídicos se realizó mediante la tinción de Rojo Oleoso O (Sigma-Aldrich). El Rojo Oleoso O fue preparado como una solución Stock al 5% en isopropanol en constante agitación toda la noche a 4°C. La solución se filtró a través de un Filtro Whatmann® y una dilución 6:4 (Rojo Oleoso O/Agua Mili-Q) se preparó y se incubó a temperatura ambiente por al menos 20 minutos previos a su uso. La solución se filtró a través de un filtro Millex-GP® de 0.2 µm. Para la tinción, el medio de cultivo fue retirado y las células se lavaron dos veces con PBS e inmediatamente fijadas con PFA 4%/PBS toda la noche a 4°C. Después, el PFA se retiró y las células fueron lavadas con PBS y una vez con isopropanol al 60%. Luego, las células se dejaron secar y una vez completamente secas, se agregó la solución de Rojo Oleoso O durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el colorante se removió y las células se lavaron con agua bidestilada hasta que el fondo de la placa estuviera claro. Para su cuantificación, se utilizó isopropanol puro para solubilizar el colorante atrapado en los cuerpos lipídicos. La absorbancia de esta solución fue detectada en un espectrofotómetro a 520 nm.

5.7 Western Blot

Se realizó la extracción de proteínas de los cultivos celulares con buffer de lisis RIPA (50 mM TRIS, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% NP-40, complete inhibitor cocktail de Roche Diagnostics). Se sonicaron y se cuantificaron por el método de Lowry modificado (BioRad #500-0114). Se realizó la SDS-PAGE cargando la misma cantidad de proteína por muestra en geles de acrilamida al 10 ó 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot® LV PVDF BioRad #162-0264) previamente hidratada con metanol y estabilizada en *Buffer* de Transferencia Towin sin SDS. Una vez terminada la transferencia húmeda, se bloqueó la membrana con BSA 5% en TBS – Tween 0.1% toda la noche a 4 °C. Se incubaron los anticuerpos BACE1, NF-κB p65 K310ac, NF-κB p65, SIRT1 o PPARγ toda la noche a 4 °C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween 0.1%. Se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos *Anti-Rabbit* HRP IgG (Santa Cruz #sc-2030) y *Anti-mouse* HRP IgG (Santa cruz #sc-2005) durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% cada uno de 10 minutos. Se utilizaron placas sensibles a quimioluminiscencia (Kodak) y el kit de Immobilon de Millipore para la detección de la señal. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ® mediante la cuantificación del área bajo la curva que refleja la densidad por pixeles de las bandas observadas en las placas sensibles a quimioluminiscencia.

5.7.1 Descripción de Anticuerpos utilizados para Western Blot

Tabla 2 Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas

Anticuerpo primario	Especie	Marca	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Acetyl-NF-κB p65 (Lys 310)	Anti-conejo (Rabbit)	Cell Signaling (#3045)	1:500	1:10000
NF-κB p65	Anti-ratón (Mouse)	Santa Cruz (#sc-8008)	1:1000	1:10000
BACE-1	Anti-conejo (Rabbit)	Cell Signaling (#5606)	1:2000	1:15000
SIRT1	Anti-ratón (Mouse)	Cell Signaling (#8469)	1:500	1:10000
PPARγ	Anti-conejo (Rabbit)	Cell Signaling (#2443)	1:500	1:10000
Actina	Anti-ratón (Mouse)	Sigma (#A5316)	1:2000	1:10000

5.8 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se extrajo el RNA total mediante el método de TRIzol® (Life technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Brevemente, se agregaron 500 µL de TRIzol a cada caja de 60 mm x 15 mm. Se rasparon las células y se congelaron a -20 °C durante 1 día. Se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 200 µL por mL de TRIzol de cloroformo frío, se agitaron fuertemente durante 15 segundos y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo (la fase orgánica e interfase se pueden almacenar para la extracción de proteínas y DNA). Se agregaron 500 µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión suave. Se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet formado con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 10000 g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Este último paso se repitió de 2 a 3 veces. Se dejó secar el pellet, no por completo, al aire libre y se agregaron 30 µL de agua libre de RNAsas. Se dejó incubar durante 20 a 40 minutos a 55°C para disolver el pellet. Posteriormente, la cuantificación de la concentración de mRNA se realizó utilizando el NanoDrop 2000 de ThermoScientific. Después se evaluó la integridad del RNA extraído con un gel de agarosa al 1.2% en condiciones desnaturalizantes con urea (200 mM concentración final en la mezcla con la muestra). Una vez comprobada la integridad del RNA extraído se realizó la reacción de retrotranscripción con 1000 ng de RNA para obtener el cDNA. Esta reacción se llevó a cabo con el Kit de Promega ImProm II Reverse Transcription System. Una vez obtenido el cDNA, las reacciones para el PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron con 20 ng de cDNA. Se utilizó como control de carga el gen endógeno *Gapdh*. El kit utilizado fue el SYBR fast de Kappy Biosystems en el equipo StepOne de Applied Biosystems y se analizaron los datos utilizando el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ con el mismo software del StepOne v2.3.

5.8.1 Secuencias de los primers

Tabla 3 Descripción de los primers utilizados para la cuantificación del mRNA por qRT-PCR

Gen	Número de acceso	Secuencia blanco en el mRNA	Secuencia de los primers
<i>Bace-1</i>	NM_019204.2	F: reconoce la unión del exón 5 con el exón 6.	F: 5'-AATGGACTGCAAGGAGTACAACATA-3'
		R: reconoce el exón 6.	R: 5'-CTTTCTTGGGCAACGAAGGT-3'
<i>Sirt1</i>	NM_001372090.1	F: reconoce el exón 5.	F: 5'-AGAGCCATGAAGTATGACAAAGAT-3'
		R: reconoce la unión del exón 5 con el exón 6.	R: 5'TGGGGTATAGAAGTGGGAATTAGTG-3'
<i>Angptl4</i>	NM_199115.2	F: reconoce el exón 6.	F: 5'-GGACCTTAAGTGTGCCAAGA-3'
		R: reconoce el exón 7.	R: 5'-TTTTCCAGAAGATCCCCTTT-3'
<i>Hmgcs2</i>	NM_173094.2	F: reconoce el exón 9.	F:5'-ACCTTGAACGAGTGGATGAG-3'
		R: reconoce el exón 10.	R:5'-CACCGCAGAGCAGATCCTAT-3'
<i>Rnf145</i>	NM_001105778.2	F: reconoce el exón 10.	F: 5'-TTACAACGTGTGGCTTCGTG-3'
		R: reconoce la unión del exón 10 y el exón 11.	R: 5'-GATCACAGCGGATTTTCATGTC-3'
<i>Ugt8</i>	NM_019276.3	F: reconoce el exón 5.	F: 5'- AGTACAGGCGAAAGGCATGG-3'
		R: reconoce el exón 6.	R: 5'-ATCTGATGGACAGCCGAACG-3'
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	F: reconoce la unión del exón 6 con el exón 7.	F: 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCAA-3'
		R: reconoce el exón 7.	R: 5'-CTTTAGTGGGCCCTCGGC -3'

5.9 Secuenciación de RNA

El RNA fue cuantificado utilizando el Qubit 2.0 (Invitrogen, USA) y la calidad fue evaluada utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Solo las muestras con un Número de Integridad de RNA (RIN) > 8.0 se utilizaron. Las librerías fueron construidas utilizando 500 ng de RNA, con el kit “Truseq Stranded mRNA prep kit” de Illumina, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las librerías fueron secuenciadas utilizando el equipo Illumina HiSeq2500 en “Pair-end” (2x125 bases). La profundidad de la secuenciación fue de >25 millones de lecturas.

5.10 Análisis del RNAseq

Para analizar el transcriptoma de las neuronas, primero las lecturas de baja calidad fueron filtradas utilizando trimmomatic v.0.39. Las lecturas se mapearon al genoma de la rata con STAR v.2.7.1a y también al transcriptoma de la rata con *Salmon* v.0.14.1, utilizando la versión Rnor6 con anotaciones de ensamblaje versión 6.0.95. El nivel del conteo de genes de las lecturas mapeadas al genoma fue cuantificado utilizando *featureCounts* del paquete *rsubread*. El análisis de la expresión diferencial fue realizado con DESeq2 y edgeR, con un diseño pareado ~ espécimen + tratamiento. Los genes diferencialmente expresados (DGE) fueron definidos como $FDR < 0.1$ y $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 0.5$. Los genes con expresión baja fueron filtrados del estudio previo al análisis con edgeR y usando la función *filterByExpr* y la matriz de diseño. Los términos de Gene Ontology (GO-term) y la sobre-representación de vías (*enriched pathways*) se realizó con el paquete clusterProfiler Bioconductor en todos los genes encontrados diferencialmente expresados en al menos 1 de los 4 *pipelines* definidos. Para el “Gene Set Enrichment Analysis” (GSEA) se utilizaron todos los genes expresados ordenados por su DE $-\log_{10}$ p-value.

5.11 Ensayo tipo Fluorescencia de Reflexión Interna Total (TIRF) para la actividad de BACE1

La actividad de BACE1 se determinó con un kit fluorométrico de actividad de Bace1 de Abcam (ab65357) que contiene un péptido con dos moléculas reporteras, EDANS y DABCYL. Dada la proximidad de ambas moléculas en el péptido completo, la señal fluorescente del EDANS es absorbida por el DABCYL evitando que pueda detectarse. Al llevarse a cabo la proteólisis del péptido por BACE1, ambas moléculas reporteras se alejan y la fluorescencia del EDANS puede ser detectada. Brevemente, después de las 24 horas de exposición a AP, el medio de cultivo fue removido y las células se lavaron dos veces con PBS frío. El *buffer* de extracción (incluido en el kit) se agregó a las células y se homogenizaron suavemente con una pipeta. Las células se incubaron en el *buffer* de extracción durante 30 minutos y se centrifugaron por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo. Las muestras fueron analizadas en una placa de 96 pozos oscura con fondo transparente. En los pozos, a cada muestra se le añadió *buffer* de reacción (incluido en el kit) y el sustrato de la β -secretasa (el péptido con las dos moléculas reporteras incluido en el kit fluorométrico). Además, en cada ensayo se incluía un pozo control sin la muestra para restar la lectura de la mezcla del *buffer* de extracción, *buffer* de reacción y el sustrato de la β -secretasa. La fluorescencia fue cuantificada cada 15 minutos durante 1 hora utilizando un lector de microplacas a $\text{Ex/Em}=335/495$ nm.

5.12 Inmunofluorescencia

Para evaluar la morfología neuronal y la distribución de las proteínas MAP2 y BACE1 las neuronas se sembraron sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS estéril) y esterilizados en cajas de 12 pozos. Después del tratamiento con AP, el medio de cultivo fue removido y las células fueron lavadas tres veces con PBS frío. Luego, las células se fijaron con PFA 1%/PBS frío por 5 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Las células se permeabilizaron con 0.3% Triton X-100/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con solución de bloqueo (para MAP2: BSA 4%/PBS; para BACE1: Suero de caballo 1%/PBS) en agitación suave por 1 hora a temperatura ambiente. Durante toda la noche a 4°C se incubaron las células con anti-MAP2 (Millipore #MAB378) o anti-

BACE1 (Cell Signaling #5606) en solución de bloqueo. Después se lavaron tres veces con 0.3% Triton X-100/PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse 1:1000 (Invitrogen #A21202) o Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 1:1000 (Invitrogen #A27034) durante 2 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente los núcleos fueron tenidos con DAPI en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y se cubrieron con medio fluorescente de montaje (DAKO). Los controles negativos fueron realizados excluyendo la incubación del anticuerpo primario del procedimiento.

5.12.1 Tratamiento de cubreobjetos para cultivo de neuronas

Es necesario tratar los cubreobjetos para permitir que las neuronas se adhieran adecuadamente. Para esto se realizan los siguientes pasos:

1. Colocar los cubreobjetos en un recipiente de cristal con pinzas. Evitar el contacto de los cubreobjetos con las manos.
2. En un vaso de precipitados agregar extrán al 5% en agua y dejar por toda la noche.
3. Lavar con agua estéril por 30 minutos en agitación. Cada 10 minutos hacer cambio de agua.
4. Después lavarlos con alcohol etílico al 95% y ácido acético al 5% durante 30 minutos en agitación.
5. Lavarlos con alcohol etílico al 95% en agua durante 15 minutos en agitación.
6. Mantenerlos etanol absoluto durante toda la noche. Asegurarse de que siempre los cubreobjetos estén cubiertos por etanol.
7. Descartar el alcohol del vaso, tapar el vaso con papel aluminio y esterilizar en autoclave. Dejar secar y enfriar sin destapar el vaso.
8. Colocar los cubreobjetos en el fondo de la caja Petri o cajas de pozos utilizando las pinzas y en campana de cultivo. Agregar la dilución de poli-L-lisina de trabajo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS estéril) y dejar en la incubadora una noche antes de realizar el cultivo.

5.13 Microscopía confocal y cuantificación de la distribución de BACE1

Las observaciones se hicieron con el microscopio confocal Nikon A1R (Nikon Instruments Inc) con los objetivos Plan Apo 20 \times (N.A. 0.75), Plan Apo 40 x oil (N.A. 0.95) y Plan Apo 60 \times water (N.A. 1.2). Las imágenes digitales fueron obtenidas con el NIS-Element C imaging software (Nikon). Imágenes digitales XYZ se adquirieron para las inmunofluorescencias de cada proteína por separado (BACE1 o MAP2).

Para la cuantificación de la distribución de BACE1 se siguió una metodología reportada [228]. Brevemente, por campo se seleccionó una neurona madura con neuritas largas y árbol dendrítico bien desarrollado. Se realizaron proyecciones en Z de cada imagen y por neurona se trazaron segmentos lineales de 1 pixel de ancho a lo largo de 50 micrómetros de una neurita aleatoria. Veinte imágenes de cultivos independientes fueron cuantificadas por condición experimental (n=3) para un total de 60 neuronas por condición. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia con el software ImageJ®.

5.14 Fraccionamiento nuclear

Para comenzar a caracterizar el enriquecimiento de PPAR γ en el núcleo como una medida de su activación se realizó un fraccionamiento nuclear utilizando el kit Nuclear Extraction Kit (Millipore #2900). Brevemente, utilizando un *Scraper* se removieron las neuronas y se recolectaron en un tubo de 15 mL para centrifuga. Se realizaron dos lavados, cada uno con dos volúmenes de PBS frío. Se centrifugó a 250 x g por 5 minutos a 4 °C. Se estimó el volumen del pellet y se agregaron 5 volúmenes de pellet del *buffer* de lisis citoplasmático (incluido en el kit y previamente suplementado con 0.5 mM DTT y un cocktail de inhibidores de proteasas). Se resuspendió el pellet por inversión lenta y suave. Se dejó incubar por 15 minutos en hielo y al término de este tiempo se centrifugó a 250 x g por 5 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en dos volúmenes de pellet de buffer de lisis citoplasmático frío. Con la ayuda de una jeringa de insulina se resuspendió el pellet, evitando hacer espuma. Esto se realizó de 5 a 10 veces. A

continuación, se centrifugó a 8,000 x g por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó a -80 °C ya que contenía la fracción citoplasmática. El pellet restante se resuspendió en 2/3 del volumen de pellet original con *buffer* de extracción nuclear frío (incluido en el kit y previamente adicionado con 0.5 mM DTT y un cocktail de inhibidores de proteasas). Con la ayuda de una jeringa de insulina se resuspendió el pellet, evitando hacer espuma. Esto se realizó de 5 a 10 veces. Una vez realizado esto, se colocó la muestra en un agitador orbital a baja velocidad durante 60 minutos a 4 °C. Finalmente, se centrifugó la muestra a 16,000 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó a -80 °C ya que es la fracción nuclear.

5.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 5® (La Jolla, CA, EU) para todos los experimentos, exceptuando los análisis transcriptómicos. Todos los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM de por lo menos n = 3 de cultivos independientes. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para la evaluación estadística de todos los experimentos, excepto para la cuantificación del consumo de glucosa (prueba pareada de Wilcoxon) y para la cuantificación del índice NAD⁺/NADH (ANOVA de una vía con la prueba de Kruskal-Wallis). El valor de significancia para el análisis de los resultados obtenidos se indica en cada gráfica.

6. RESULTADOS

6.1 Cambios metabólicos en las neuronas hipocampales tras la exposición a AP.

Primero se analizó el efecto en la viabilidad neuronal de la exposición a diferentes concentraciones de AP por 24 horas mediante el ensayo de reducción de MTT. No se observaron efectos tóxicos con concentraciones de hasta 200 μ M ni cambios morfológicos evidentes (Anexo 1, Fig. 20). Sin embargo, con la dosis de 300 μ M se observó una reducción en la viabilidad de las neuronas hipocampales de aproximadamente el 40% (Fig. 9a). Dado lo anterior, las dosis de 150 y 200 μ M mostraron ser adecuadas para estudiar los efectos del AP además de ser concentraciones que se han reportado en el plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes diabéticos y con obesidad.[47–50]

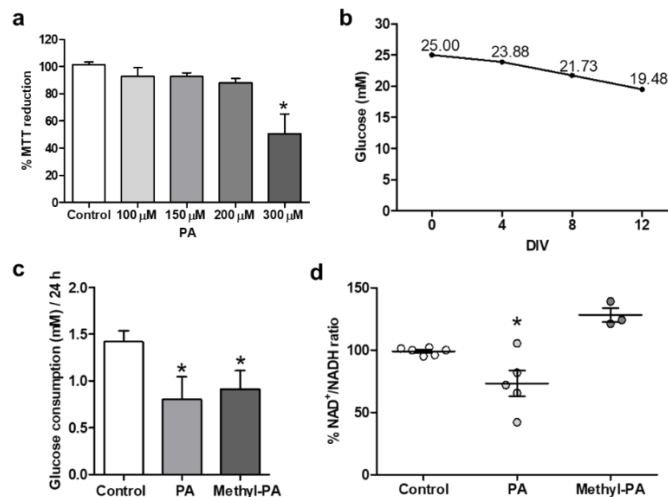


Figura 9 Disminución en el consumo de glucosa y la cantidad de NAD⁺ tras la exposición al AP. (a) La viabilidad neuronal fue evaluada mediante el ensayo de MTT después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de AP. (b) La glucosa del medio de cultivo disminuye a lo largo de los DIV. (c) A los 12 DIV el AP y el MP reducen el consumo de glucosa por parte de las neuronas. (d) El índice NAD⁺/NADH disminuyó después de 24 horas de exposición a 200 μ M con AP, pero no con MP. Los datos son el promedio \pm S.E.M. de 3 a 5 cultivos neuronales independientes por duplicado. *P<0.05 vs. Condición control.

Las neuronas utilizan a la glucosa como principal fuente energética y dado que no existe evidencia clara sobre el uso de los SFA como sustratos energéticos, se mantuvieron los cultivos neuronales durante 12 D/V sin cambio de medio para que se redujera la concentración de glucosa (Fig. 9b) y posiblemente utilizaran al AP como sustrato energético. Adicionalmente, se utilizó el MP como control de los experimentos metabólicos, ya que es un análogo del AP que puede ser internalizado pero que no se metaboliza. Pasados los 12 D/V se cuantificó el consumo de glucosa por parte de las neuronas en un periodo de 24 horas con y sin AP o MP. Después de haber expuesto a las neuronas al AP o al MP, el consumo de glucosa fue significativamente menor comparado con el grupo control (Fig. 9c). Esto sugiere que las neuronas pueden internalizar ácidos grasos en sus diferentes formas químicas en condiciones donde la concentración de glucosa es baja y la de los SFA se incrementa.

Finalmente, dado que el sistema redox celular es de suma importancia para el metabolismo energético neuronal, se cuantificó el índice $NAD^+/NADH$ tras 24 horas de tratamiento con AP o MP. Solamente se observó una reducción en este índice cuando las neuronas hipocampales están expuestas a AP y no con el MP (Fig. 9d), indicando que la internalización del AP y no del MP altera el metabolismo energético neuronal.

6.2 El AP se asocia con una disminución en el contenido y actividad de SIRT1.

La actividad de SIRT1 está estrechamente ligada con el contenido intracelular de NAD^+ por lo que una alteración en esta molécula afecta las funciones de la HDAC. Previamente se cuantificó el contenido proteico de SIRT1 (Fig. 10a), así como su actividad mediante el análisis de un blanco específico: la acetilación en la lisina 310 (K310ac) de p65 (Fig. 10c). Los niveles de SIRT1 disminuyeron y la K310ac de p65 se observó aumentada, ambas de manera dependiente de la dosis. Este último dato, se observó también cuando las neuronas fueron tratadas con un inhibidor específico de SIRT1, EX527, a una dosis de 50 μ M (Fig. 10d) y en ausencia de AP. Adicional a esto, se observó un aumento en el mRNA de *Sirt1* cuando las neuronas son expuestas por 24 horas al AP (Fig. 10b). Estos datos sugieren que condiciones metabólicas que afecten el balance $NAD^+/NADH$ intracelular pueden ser detectadas por proteínas como SIRT1, modulando su actividad y alterando la función de factores de transcripción, como p65.

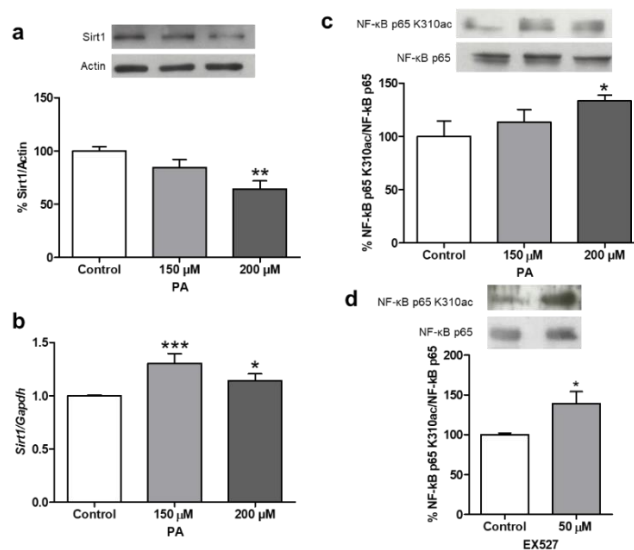


Figura 10 SIRT1 cambia su contenido, expresión y actividad en neuronas hipocampales tras la exposición a AP. (a) La cantidad de proteína de SIRT1 disminuye después de 24 horas de exposición a 150 ó 200 μ M de AP, mientras que su mRNA (b) incrementa con las mismas condiciones. Además, la exposición a AP (c) o al inhibidor de SIRT1 EX527 (d) incrementa la K310ac de p65, reflejando la actividad inhibitoria de la actividad de SIRT1 por parte de ambos compuestos. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Condiciones control.

6.3 La actividad y localización de BACE1 se modifican cuando las neuronas son expuestas al AP.

Existen estudios que reportan la participación de SIRT1 a diferentes niveles en la regulación de las proteínas implicadas en el procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP. Dado esto, se caracterizó el efecto de la exposición neuronal al AP en la expresión génica, actividad y localización de la enzima BACE1 que está implicada en el procesamiento amiloidogénico de la APP. El mRNA de *Bace1* mostró un ligero incremento con ambas dosis de AP (Fig. 11a) mientras que la dosis de 200 μM de AP indujo un aumento significativo en la cantidad de proteína de BACE1 (Fig. 11b), dato que previamente se había observado en el laboratorio en este mismo modelo de neuronas de hipocampo [229]. Adicionalmente, la actividad de BACE1 se encontró aumentada cuando las neuronas se expusieron a 200 μM de AP (Fig. 11c). Para comprobar que SIRT1 aumentaba el contenido proteico de BACE1, se trataron a las neuronas con un inhibidor específico de esta HDAC, el EX527. Este compuesto incrementó la cantidad de BACE1 (Fig. 11d), mostrando resultados similares que el AP (Fig. 11b).

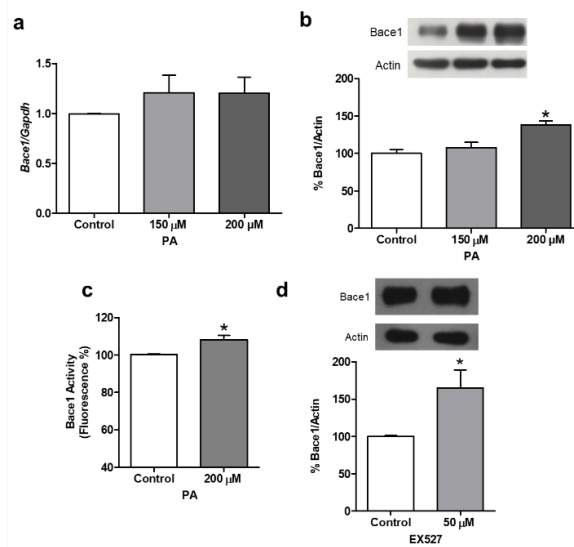


Figura 11 El AP induce cambios en BACE1. (a) Después de 24 horas de tratamiento con AP, el mRNA de *Bace1* incrementa ligeramente, (b) pero la proteína y (c) la actividad enzimática aumentan significativamente con 200 μM de AP. (d) El incremento en la cantidad proteica de BACE1 también se observó cuando se agrega el inhibidor de SIRT1 EX527. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 3 a 6 experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs condiciones control.

La localización de BACE1 en la neurona es importante ya que su actividad ocurre preferentemente en las terminales sinápticas. Dado esto, se caracterizó la localización de BACE1 después del tratamiento con el AP (Fig. 12a). El tratamiento de las neuronas hipocampales con este SFA generó que BACE1 tuviera una mayor localización en las neuritas sin cambio alguno en el soma comparado con la condición control (Fig. 12b). Estos resultados muestran que el AP a través del metabolismo energético puede inhibir a SIRT1 y activar a BACE1. Además, el incremento en el contenido de BACE1 puede observarse localizado preferentemente en las neuritas, donde podría procesar a la APP para generar los fragmentos $\text{A}\beta$.

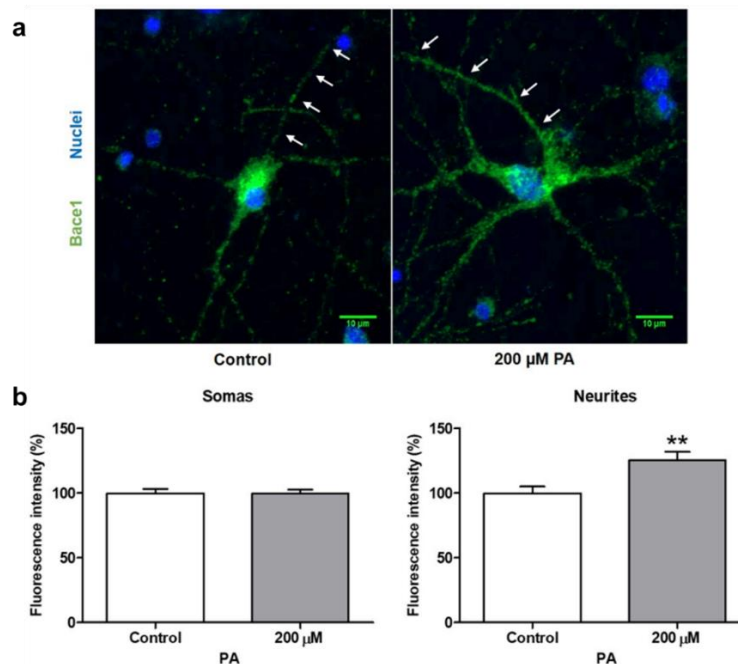


Figura 12 El AP induce la relocalización de BACE1 hacia las neuritas. (a) BACE1 se observa con una localización predominante en el soma (a, panel izquierdo). Tras un tratamiento de 200 μM de AP, la proteína BACE1 se concentra preferentemente en las neuritas (a, panel derecho). (b) La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia del soma o a lo largo de 50 μm de una neurita aleatoria por neurona. Verde = BACE1, azul = núcleo, las flechas blancas señalan la neurita que fue seleccionada al azar para la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 20 neuronas por condición de 3 experimentos independientes. $**P < 0.01$ vs condición control.

6.4 La morfología neuronal no se altera con una dosis no citotóxica de AP

Para continuar caracterizando los cambios neuronales inducidos por la exposición al AP, se realizaron inmunofluorescencias para observar y determinar si existen consecuencias morfológicas en la integridad de las neuritas tras el tratamiento de 24 horas. Este análisis cualitativo reveló que la distribución de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) se localiza principalmente en las neuritas y no es tan abundante en el soma neuronal en la condición control y hasta con una dosis de 200 μM de AP (Fig. 13a), confirmando los resultados observados en campo claro (Anexo 1, Fig. 20). Sin embargo, las neuronas que fueron expuestas a una dosis de 300 μM de AP presentan un ligero aumento en la presencia de MAP2 en el soma y un patrón fragmentado de la continuidad de la proteína en las neuritas (Fig. 13a). Esta distribución anormal de MAP2 sugiere una interrupción del marcaje posiblemente por un hinchamiento localizado, que podría estar relacionada con los efectos tóxicos del AP previamente observados (Fig. 9a) con 300 μM . Adicional a esto, se estimó el contenido lipídico intracelular en las neuronas tras la exposición a AP mediante la tinción de Rojo Oleoso. La cuantificación espectrofotométrica reveló que el contenido de gotas lipídicas aumenta a las 24 horas de la exposición con AP (Fig. 13b). El aumento en la cantidad de rojo oleoso, la disminución del consumo de glucosa (Fig. 9c) y la reducción del índice NAD⁺/NADH (Fig. 9d) demuestran que las neuronas hipocámpicas pueden incorporar y metabolizar este SFA.

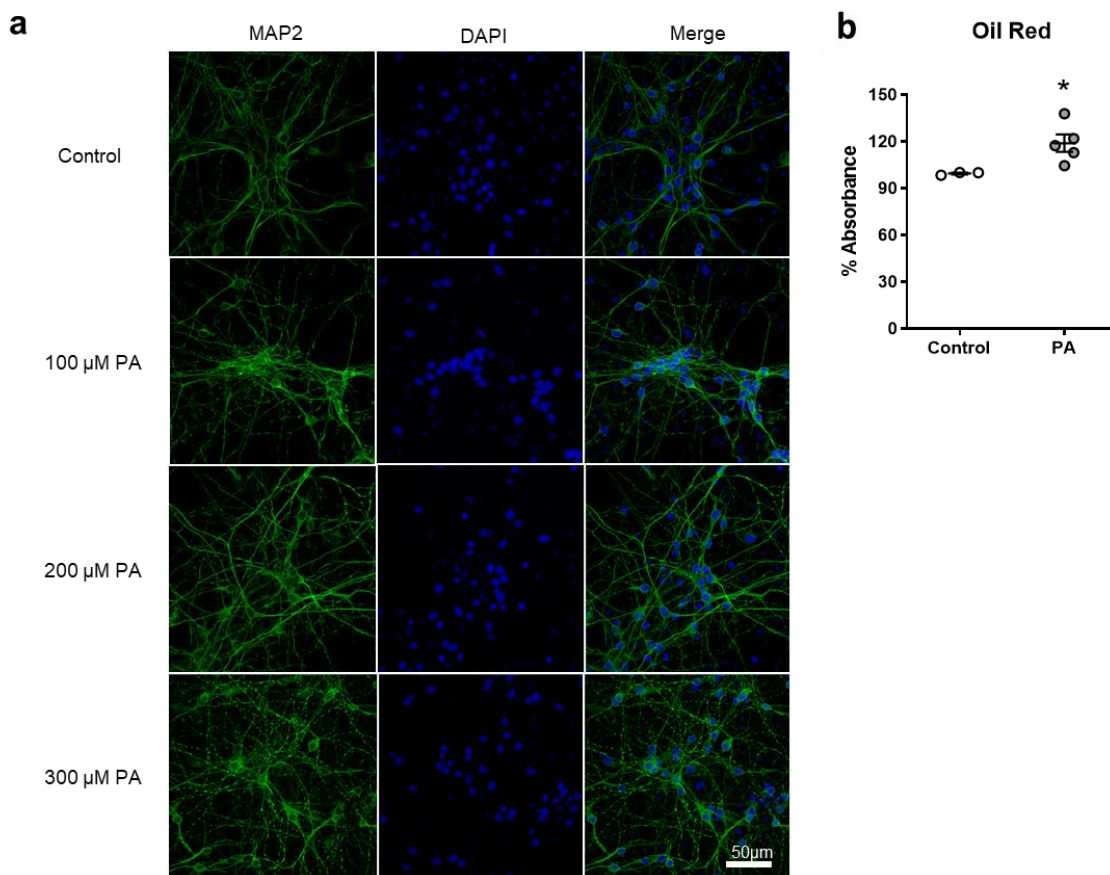


Figura 13 La morfología neuronal se preserva y hay presencia de cuerpos lipídicos en las neuronas después del tratamiento con AP. (a) Imágenes representativas de la inmunodetección de MAP2 (verde) y núcleos teñidos con DAPI (azul) obtenidas por microscopía confocal. Se observa la morfología de las neuritas después de 24 horas de tratamiento con el vehículo, 100 μ M, 200 μ M y 300 μ M de AP. (b) Cuantificación espectrofotométrica de la tinción de Rojo Oleoso. * $P < 0.005$. $N = 3$.

6.5 El AP genera cambios en el perfil transcripcional de las neuronas

Una forma de integrar los efectos pleiotrópicos de algún compuesto es mediante la respuesta del transcriptoma celular. Sin embargo, los reportes sobre cómo el AP altera la regulación génica en su mayoría son en tejidos periféricos y escasos en neuronas. Por lo tanto, se realizó un RNAseq de 3 cultivos independientes, cada muestra pareada, condición “control” y experimental “24 horas de exposición a 200 μ M de AP” ($n = 3$ por condición). Los métodos de mapeo tienen sensibilidades diferentes para detectar los cambios en la expresión, principalmente por el tipo de transcritos que pueden identificar [230]. El alineamiento al transcriptoma de los fragmentos secuenciados tiene una mayor sensibilidad para detectar variantes generadas por *splicing* alternativo que el alineamiento al genoma. Sin embargo, el alineamiento al genoma puede revelar transcritos no anotados. Dado esto, las secuencias se alinearon tanto al genoma como al transcriptoma de la rata. Adicionalmente, para cada tipo de alineamiento se emplearon dos métodos de análisis de expresión diferencial (DESeq2 y edgeR), ya que cada uno utiliza diferentes algoritmos de normalización para calcular la dispersión de los fragmentos secuenciados y así poder establecer la significancia estadística. Por lo tanto, la cantidad de genes diferencialmente expresados (DEGs) detectados puede variar según el método utilizado [231]. La combinatoria de los 2 tipos de alineamiento y los 2 tipos de análisis de expresión diferencial dieron como resultado 4 métodos para el análisis del RNAseq (Fig. 14a). Este análisis múltiple reveló que la expresión génica no se altera drásticamente ($FDR < 0.1$; $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 0.5$) (Fig. 14), donde 45 genes incrementan su expresión y 30 genes

la reducen (Fig. 14a, b). Resultados similares se observaron en un modelo de islotes pancreáticos humanos tratados con AP donde a 24 horas de exposición cerca de 150 genes alteraban su expresión y el número aumentaba a lo largo de 7 días de exposición [232].

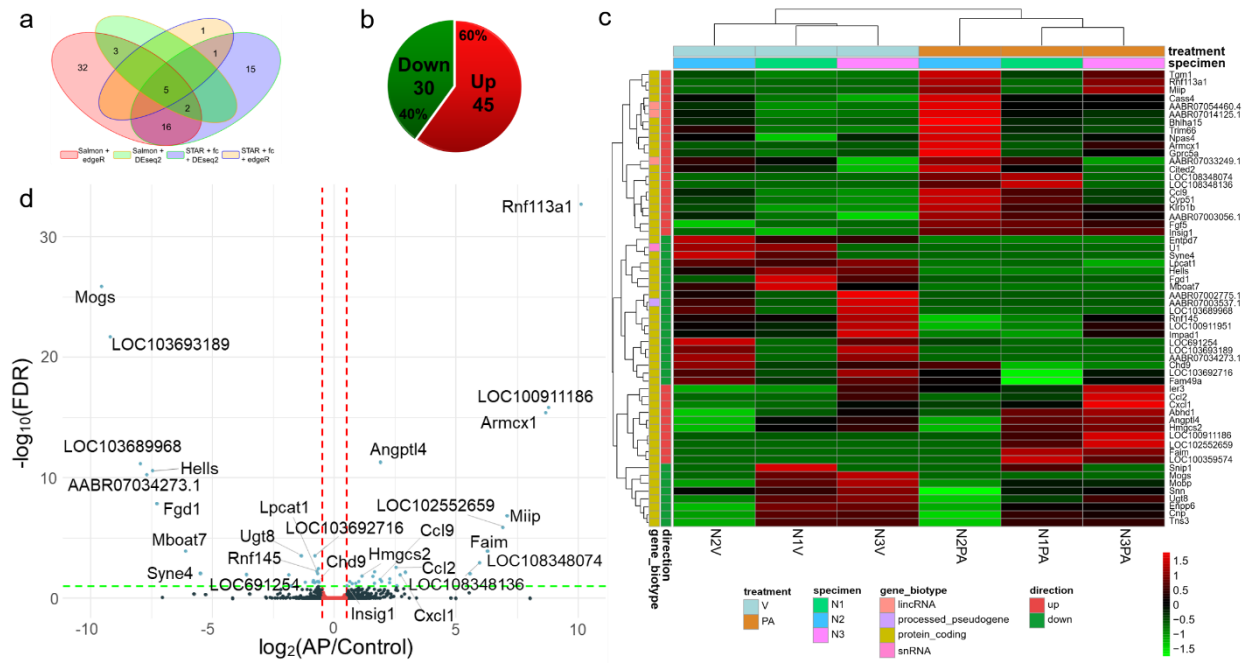


Figura 14 Cambios en el transcriptoma de las neuronas hipocámpales expuestas al AP. (a) Número de DEGs encontrados con el RNAseq usando los diferentes métodos de análisis. (b) Gráfica de pastel mostrando el número y porcentaje de DEGs que están sub-expresados y sobre-expresados. (c) Mapa de calor que muestra el agrupamiento jerárquico del grupo control (v) vs el experimental (PA). (d) Gráfica de volcán de los DEGs. Los genes que muestran una significancia estadística se encuentran por encima de la línea punteada verde y a la derecha o izquierda de las líneas punteadas rojas.

Es interesante destacar que la cantidad de DEGs observada utilizando el método de análisis edgeR es mayor a comparación del método DESeq2 (Fig. 14a y Tabla 4). Esto se debe a los métodos que utilizan para estimar la varianza biológica y técnica de la muestra. DESeq2 toma el valor máximo/mínimo en cada muestra para crear una tendencia media y determinar si los cambios observados son estadísticamente significativos [231, 233, 234]. Dado esto, si la varianza es relativamente pequeña, el conteo lo considera como parte de la media, es decir sin cambios. En cambio, edgeR toma el valor máximo/mínimo detectado en cada gen para crear una tendencia media y determinar si los cambios observados son estadísticamente significativos [231, 233, 234]. Esto permite que edgeR considere tanto la varianza biológica como la técnica (varianza del experimentador) de una muestra, siendo este método el más adecuado para la identificación de los DEGs en el modelo experimental. Sin embargo, los métodos de análisis muestran algunos genes compartidos, por ejemplo, los cuatro identificaron a *Angptl4*, *Ugt8* y *Rnf145*, mientras que los métodos de análisis que incluyeron a edgeR muestran algunos otros como *Hmgcs2*, *Ccl2* e *Insig1* (Tabla 4). Esto sugiere que hay genes desregulados fuertemente ya que se pueden identificar con cualquiera de los 4 métodos de análisis. Aunque principalmente se observan genes con cambios sutiles en su expresión por lo que solo algunos de los métodos los detectaron. No obstante, todos estos genes son importantes para la respuesta neuronal ante una exposición a AP.

Tabla 4 Genes diferencialmente expresados encontrados en cada uno de los métodos de análisis y alineamiento al genoma o transcriptoma de la rata.

Salmon + DEseq2	Salmon + edgeR	STAR + fc + edgeR	STAR + fc + DEseq2
	Rnf113a1, Mogs, LOC103693189, LOC100911186, U1, Armcx1, AABR07003537.1, LOC103689968, AABR07034273.1, Fgd1, AABR07002775.1, Miip, Entpd7, LOC102552659, Faim, Mboat7, LOC108348074, LOC108348136, Syne4, LOC100359574, LOC691254, Cass4, Ccl9, Chd9, LOC100911951, Enpp6, Impad1, Klrb1b, Abhd1, AABR07003056.1, AABR07014125.1, Snip1	Serpine1, Slc16a5, Fndc3c1, Mir132, AABR07038886.1, Ucp2, Mir212, Acot1, AABR07003751.1, AABR07065531.19, 5S_rRNA, Rd3l, Maff, Pdk4, AABR07017825.7	Nfil3
Hells, LOC103692716, AABR07033249.1		Mki67	
	Lpcat1, Npas4		
	Ccl2, AABR07054460.4, Ier3, Gprc5a, Mobp, Cxcl1, Hmgcs2, Bhlha15, Trim66, Tns3, Cyp51, Fam49a, Tgm1, Cited2, Fgf5, Insig1		
	Angptl4, Ugt8, Cnp, Rnf145, Snn		

Para observar si las muestras tienen un comportamiento similar se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de los DEGs encontrados con los métodos “Salmon + edgeR” y “STAR + fc + edgeR”. Con este análisis se observó que las muestras se agrupan según la condición experimental (control o tratamiento) con base en el perfil de expresión (Fig. 14c). De manera interesante se observa que dos muestras de cada grupo experimental (N1 y N3) tienen mayor similitud entre ellas que con la tercera muestra (N2). Dado esto, se realizó un análisis de componente principal (PCA) (Anexo 1, Fig. 21) donde se grafica qué tan diferentes pueden llegar a ser las muestras y las condiciones experimentales considerando las varianzas. De manera interesante, se observa que entre las muestras control (N1V, N2V, N3V) y las tratadas con AP (N1PA, N2PA, N3PA) no existe una diferencia grande como aquella que se observa entre los cultivos independientes de los que provienen cada par de muestras (N1 vs. N2 vs. N3). Esto concuerda con la cantidad de DEGs encontrada en los análisis (Fig. 14a, b) y podría sugerir que la concentración y el tiempo del tratamiento deberían ser mayores para inducir mayores varianzas que permitan el agrupamiento de las muestras por tratamiento.

El análisis de expresión diferencial (Fig. 14c, d), además de mostrar a los genes codificantes que se desregulan tras la exposición a AP, reveló que 24 RNAs no codificantes, como RNAs intergénicos no codificantes largos (LincRNAs) y RNAs pequeños nucleares (snRNAs), también cambian su expresión. Todos estos datos en conjunto demuestran que la exposición a tiempos cortos de AP es suficiente para inducir cambios en el perfil transcripcional de las neuronas y sugiere que los mecanismos celulares, incluso hasta aquellos de función nuclear, se alteran.

6.6 Activación de vías inflamatorias y cambios en el metabolismo lipídico neuronal inducidos por la exposición a AP

Para poder determinar los procesos biológicos y los DEGs asociados a estos que se modifican en las neuronas después de la exposición a AP se realizaron análisis de enriquecimientos de vías. Se utilizaron dos bases de datos “Gene Ontology” (GO) y “Reactome pathways”. El análisis con GO (Fig. 15a, b) mostró que entre los 20 procesos biológicos funcionalmente enriquecidos se encuentran vías que median la respuesta a quimiocinas, respuesta a ácidos grasos y quimiocinas, la vía de biosíntesis del colesterol y la función de la insulina. Estos procesos al encontrarse mayormente desregulados indican que son importantes en la respuesta neuronal al AP.

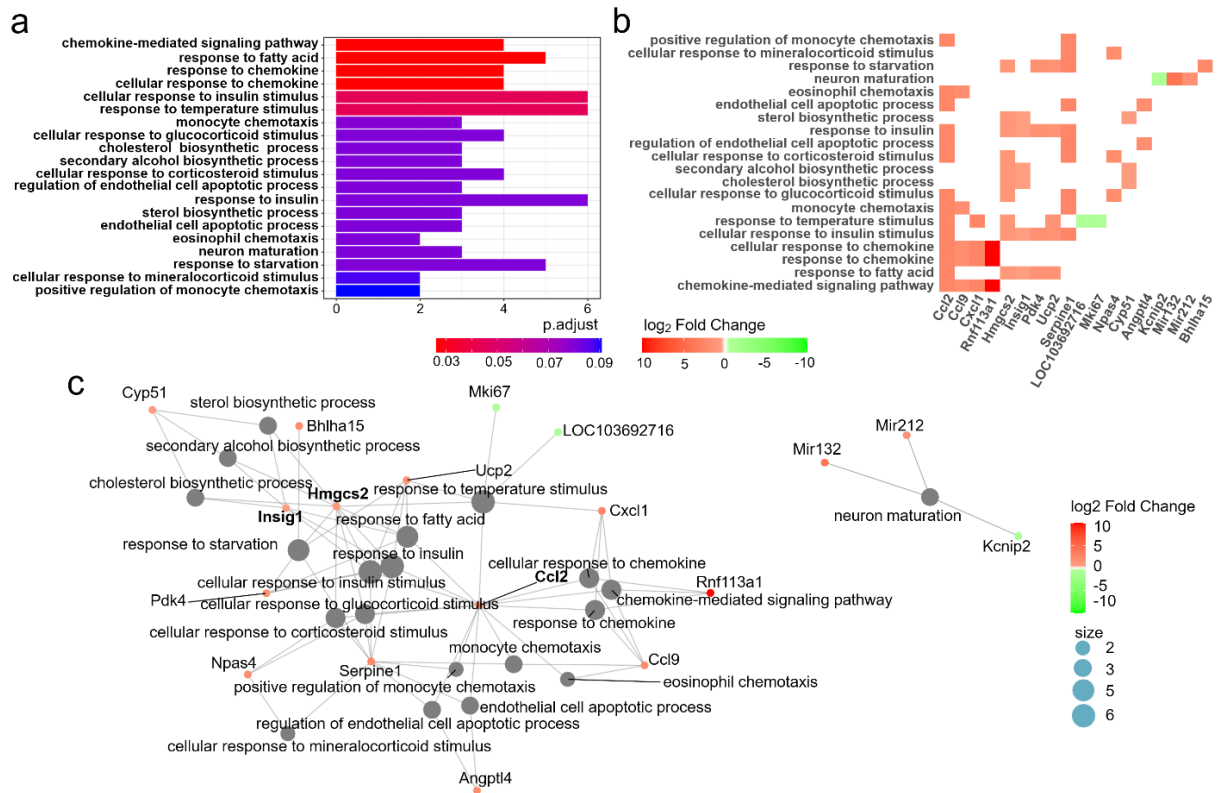


Figura 15 Análisis de enriquecimiento funcional con los términos encontrados en GO demuestra procesos inflamatorios y metabólicos alterados en las neuronas expuestas a AP. (a) Los 20 procesos biológicos mayormente enriquecidos ordenados por significancia estadística (prueba hipergeométrica $FDR < 0.1$) en respuesta al tratamiento con AP. (b) Mapa de calor de los genes que se asocian a los términos GO encontrados, cada cuadro representa el cambio en la expresión de los genes individuales (eje x) y el proceso biológico al que están asociados (eje y). (c) Red de interacción de los genes y los términos de GO, donde los círculos grises representan los procesos biológicos y los círculos con escala de colores verde-rojo son los DEGs que vinculan estos procesos.

Dado que es importante identificar cuáles de los DEGs están asociados a estas vías y respuestas reveladas por el análisis con GO y la posible existencia de vínculos entre dos o más procesos, se generó una red de interacción (Fig. 15c). Con la red se observa un solo componente interconectado, lo que sugiere que la mayoría de los genes que pertenecen a estos términos de GO están estrechamente relacionados y participan en procesos similares. Genes como *Hmgcs2* e *Insig1* se muestran como importantes de un nodo perteneciente al metabolismo energético, ya que juegan un papel importante en la respuesta a ácidos grasos, insulina, privación de nutrientes y la biosíntesis del colesterol. Adicional a esto, la red de interacción revela genes implicados en la respuesta a quimiocinas y su vía de señalización que además participan el metabolismo de lípidos, como *Ccl2*. Estos datos sugieren que el AP está alterando el metabolismo energético neuronal a través de la inducción de genes específicos que participan en procesos como el metabolismo de lípidos y la respuesta inflamatoria.

Para confirmar e identificar algunos otros procesos biológicos afectados en las neuronas por la exposición a AP, se realizó el mismo análisis de enriquecimiento funcional con otra base de datos: Reactome pathways (Fig. 16). Este análisis confirmó los resultados previos de GO ya que también mostró al metabolismo de lípidos y al ciclo de los ácidos grasos como procesos alterados ante la respuesta del estímulo con AP. Adicionalmente, se encontraron otros procesos que no involucran directamente a los SFA pero que responden ante la exposición como el transporte a través de canales iónicos y, de manera interesante y sumamente importante, procesos que si los involucran como la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (Fig. 16a, b). Este hallazgo es importante dado que la funcionalidad y activación de esta vía es controversial en neuronas.

Adicionalmente, el análisis de la red de interacciones reveló que múltiples genes desregulados, como *Ugt8*, *Cyp51*, *Acot1* y *Echs1*, están involucrados en el metabolismo de lípidos. Lo que refuerza lo dicho anteriormente, este proceso es uno de los más relevantes e importantes que se activan en respuesta a la exposición con AP (Fig. 16c). Por otro lado, *Echs1* y *Acot1* muestran ser un vínculo importante entre el metabolismo de lípidos y la β -oxidación mitocondrial (Fig. 16c), lo que sugiere que son efectores relevantes en ambos procesos.

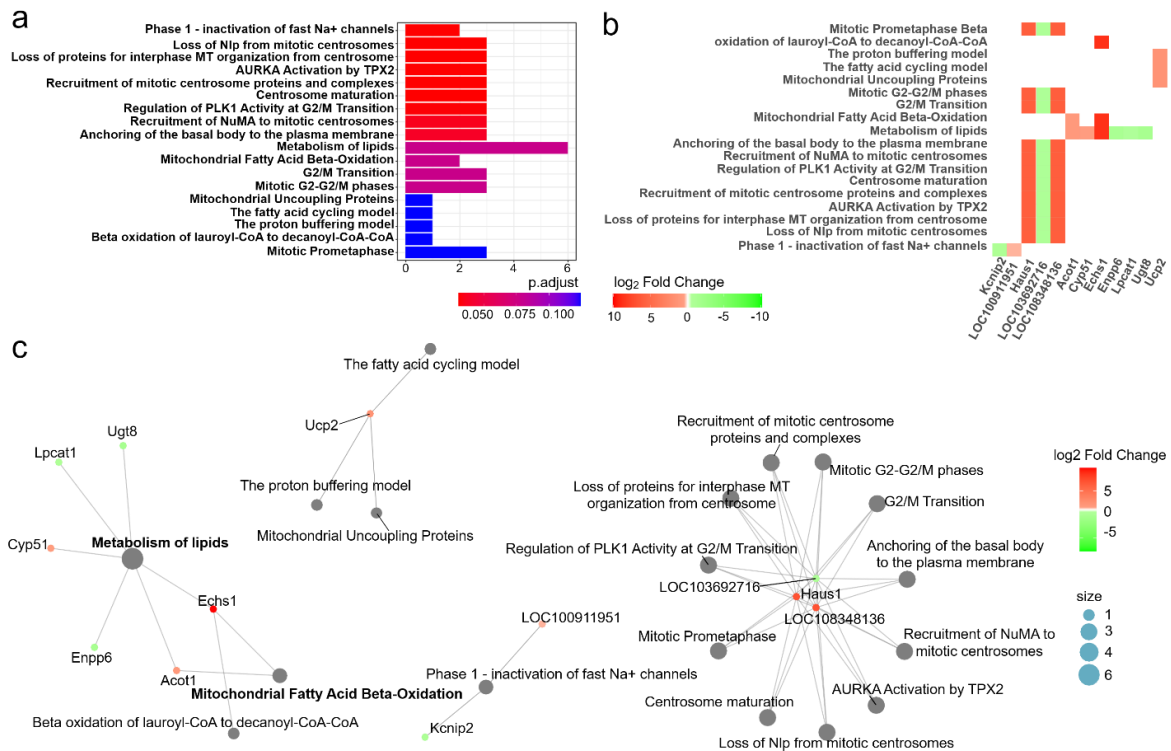


Figura 16 Análisis de enriquecimiento funcional con los términos encontrados con Reactome pathways demuestra procesos metabólicos y lipídicos alterados en las neuronas expuestas a AP. (a) Los 20 procesos biológicos mayormente enriquecidos ordenados por significancia estadística (prueba hipergeométrica FDR<0.1) en respuesta al tratamiento con AP. (b) Mapa de calor de los genes que se asocian a los términos de Reactome pathways, cada cuadro representa el cambio en la expresión de los genes individuales (eje x) y el proceso biológico al que están asociados (eje y). (c) Red de interacción de los genes y los términos de GO, donde los círculos grises representan los procesos biológicos y los círculos con escala de colores verde-rojo son los DEGs que vinculan estos procesos

Ambos análisis de enriquecimiento, GO y Reactome pathways, junto con las redes de interacción sugieren fuertemente que el AP afecta las vías y metabolismo que involucra a los lípidos. Lo cual es interesante e importante ya que no existen reportes claros sobre la activación y el papel de vías involucradas en el metabolismo de lípidos en las neuronas cuando hay altas concentraciones de ácidos grasos. Por lo que da un primer acercamiento a que cuando existen altas concentraciones de ácidos grasos, las neuronas pueden responder activando componentes de esta ruta metabólica.

6.7 Genes involucrados en el metabolismo de lípidos y regulados por la vía de PPAR alteran su expresión en neuronas expuestas a AP

El análisis de enriquecimiento funcional tiene la desventaja que solamente los DEGs son considerados. Sin embargo, otros procesos biológicos se pueden afectar cuando hay cambios sutiles en múltiples genes que forman parte de ellos. Para poder identificar estos procesos, se realizó un análisis de enriquecimiento por grupo de genes (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) con KEGG pathways (Fig.

17) y GO (Fig. 18). Este análisis toma en cuenta todos los genes que tuvieron un cambio en la expresión cuando las neuronas fueron expuestas a AP.

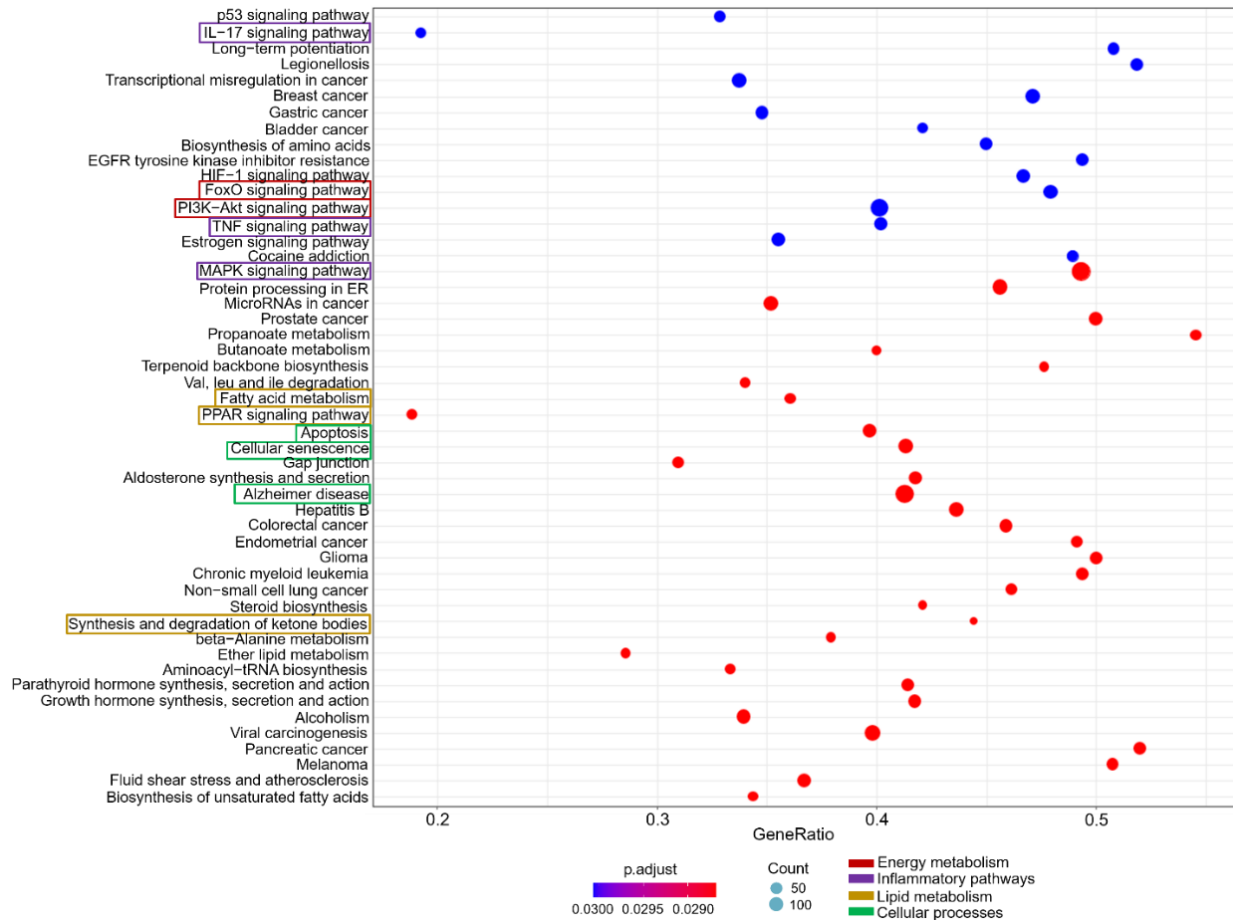


Figura 17 Análisis de enriquecimiento por grupo de genes (GSEA) proveniente de KEGG. Las vías y procesos mayormente afectados se ordenan de mayor a menor y el número de genes involucrados en cada uno de los procesos es representado por el tamaño de los círculos (count). Aquellos procesos relevantes para el metabolismo neuronal (rectángulos rojos), procesos que involucran lípidos (rectángulos amarillos), vías de inflamación (rectángulos morados) y otros procesos biológicos y celulares (rectángulos verdes) se señalan.

Entre las vías inflamatorias destacan la de IL-17, TNF y MAPK (Fig. 17) sugiriendo que el metabolismo del AP desencadena componentes inflamatorios en las neuronas. Por otro lado, estos análisis muestran que el metabolismo y catabolismo de ácidos grasos (Fig. 17, 18), la vía de PPAR (Fig. 18), la síntesis de cuerpos cetónicos (Fig. 17), la biosíntesis del colesterol y sus procesos metabólicos (Fig. 18) están igualmente alterados. Estos resultados sugieren que las neuronas tienen elementos del metabolismo de lípidos que responden a las altas concentraciones de SFA. De manera importante, el GSEA señala que procesos como apoptosis, senescencia celular, recubrimiento de neuronas y axones, axonogénesis y niveles de neurotransmisores podrían alterarse si el estímulo persiste, por ejemplo, en condiciones crónicas como la diabetes y la obesidad. Estos análisis indican que el AP puede alterar tanto mecanismos celulares generales como aquellos específicos neuronales (Fig. 18).



Figura 18 Análisis de enriquecimiento por grupo de genes (GSEA) de los términos de GO. Las vías y procesos mayormente afectados se ordenan de mayor a menor y el número de genes involucrados en cada uno de los procesos es representado por el tamaño de los círculos (count). Aquellos procesos que involucran lípidos (rectángulos amarillos) y procesos biológicos y celulares para las neuronas (rectángulos verdes) se señalan en la gráfica.

Finalmente, para validar los resultados obtenidos por el RNAseq y para demostrar que la vía de PPAR responde ante el estímulo del AP, se analizaron 4 genes mediante qRT-PCR. *Hmgcs2* (codifica para la Hidroximetilglutaril-CoA sintasa) y *Angptl4* (codifica para la Angiopoyetina tipo 4) son genes que participan en el metabolismo de lípidos y que pueden ser regulados por esta vía de señalización. Su expresión (Fig. 19a, b) mostró estar significativamente elevada en las neuronas hipocámpales que fueron expuestas a 200 μ M de AP comparado con la condición control. También se analizó a otros dos genes implicados en metabolismo de lípidos pero que no son regulados por la vía de PPAR, *Ugt8* (codifica para la 2-hidroxiacilesfingosina 1- β -galactosiltransferasa) y *Rnf145* (codifica para la Proteína de dedos RING 145). El análisis de *Ugt8* mostró una tendencia a disminuir mientras que *Rnf145* se encontró sub-expresado significativamente (Fig. 19c, d). La cuantificación de estos genes valida los datos obtenidos por RNAseq y, además, señala a la vía de PPAR como un componente importante implicado en la regulación de genes involucrados en el metabolismo lipídico y en la respuesta a la exposición neuronal a ácidos grasos. De manera general, los resultados presentados demuestran que las neuronas al ser expuestas a AP modifican su transcriptoma afectando el metabolismo de lípidos y activando componentes inflamatorios a través de mecanismos que se han demostrado responden a la presencia de ácidos grasos en tejidos periféricos.

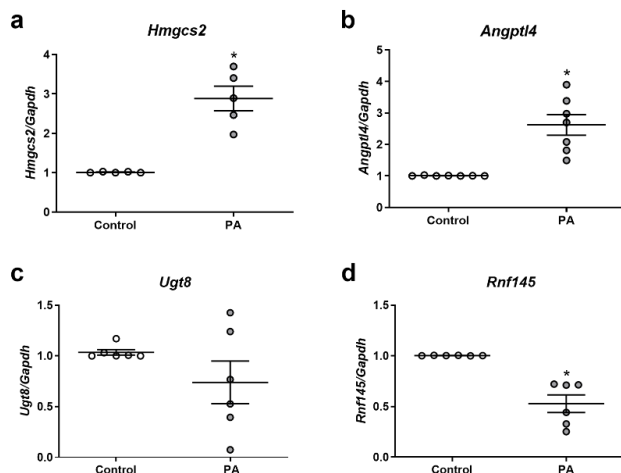


Figura 19 Expresión relativa del mRNA de los genes *Hmgcs2*, *Angptl4*, *Ugt8* y *Rnf145* tras 24 horas de tratamiento con 200 μM de AP. El análisis en la expresión por qRT-PCR muestra que cuando las neuronas son expuestas a esta concentración de AP, (a) *Hmgcs2* y (b) *Angptl4* se sobre-expresan, mientras que (c) *Ugt8* y (d) *Rnf145* se sub-expresan comparados con la condición control. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de por lo menos 5 experimentos independientes. * $P < 0.005$

7. DISCUSIÓN

El consumo de las HFD está relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas y fuertemente asociado con la predisposición a manifestar enfermedades neurodegenerativas, como la EA [211, 235–237]. Uno de los principales SFA en este tipo de dietas es el AP [68, 238]. Como se ha mencionado previamente, el AP tiene múltiples efectos, debido a que impacta a través de diferentes mecanismos celulares. Entre ellos, la capacidad de unirse a factores de transcripción, de activar vías de señalización a través de receptores de membrana, ser utilizado para el metabolismo energético o como precursor en la síntesis de otros lípidos, entre otros más [134, 140, 239, 240]. A pesar de que existe evidencia sobre los efectos en los mecanismos celulares, estos se han caracterizado principalmente en tejidos periféricos [103–105, 133] y pocos estudios se han realizado en neuronas. Sin embargo, hay trabajos que sugieren una poca actividad por parte de las neuronas para metabolizar y responder directamente a los SFA [83, 134]. Dado esto, fue de gran importancia caracterizar en neuronas hipocampales, qué respuestas metabólicas se generan ante concentraciones elevadas de AP, cómo se integran estos efectos a través del transcriptoma y cuál es un probable mecanismo por el que pudieran aparecer marcadores asociados a enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados obtenidos proveen evidencia sobre algunos cambios metabólicos neuronales tras la exposición al AP. En este sentido, se encontraron algunas alteraciones importantes como la disminución en el consumo de glucosa, la reducción del índice NAD^+/NADH y la acumulación de cuerpos lipídicos, sugiriendo que las neuronas hipocampales pueden internalizar, metabolizar y acumular el AP. Adicional a esto, mediante cambios en el transcriptoma neuronal se encontró la activación de vías involucradas con metabolismo de lípidos como respuesta que integra alguno de los efectos pleiotrópicos del AP.

La disminución en el consumo de glucosa y en el índice NAD^+/NADH después de la exposición al SFA, sugiere que este lípido puede ser utilizado como molécula energética por las neuronas. En músculo esquelético, la reducción en el consumo de glucosa ante la presencia de altas concentraciones de SFA es un mecanismo bioquímico bien caracterizado [241, 242]. Se propone que el incremento en el acetil-CoA mitocondrial provocado por la oxidación de los SFA inhibe el complejo de la piruvato deshidrogenasa, que

a su vez genera una acumulación de citrato y, probablemente, de otros metabolitos de la vía glucolítica como la glucosa-6-fosfato. Esta acumulación de metabolitos inhibe a enzimas como la fosfofructocinasa-1 y la hexocinasa, lo que reduce el flujo glucolítico y por lo tanto el consumo de glucosa [241, 242]. En el sistema nervioso central, se sabe poco sobre cómo la presencia excesiva de SFA influye en el consumo de glucosa [243]. Sin embargo, uno de los mecanismos propuestos es a través de la regulación del transportador de glucosa 3 (Glut3), el cual se expresa predominantemente en neuronas [243, 244]. Un estudio realizado por Liu *et al.* mostró que el consumo de HFD reduce la cantidad del transportador de glucosa 3 (Glut3) en ratones sometidos a este tipo de dieta [245], lo que podría estar relacionado con una disminución en el consumo de glucosa por parte de las neuronas. Sin embargo, es importante continuar caracterizando en neuronas hipocámpales los mecanismos propuestos para conocer más sobre este efecto observado en otros tejidos como en el músculo esquelético.

En el sistema periférico, el AP se metaboliza a través de la β -oxidación mitocondrial generando NADH al reducir el NAD^+ , lo que hace que este sistema sea un indicador del estado redox celular. La reducción en la cantidad de NAD^+ neuronal puede ocurrir a través de diferentes rutas e indica que las neuronas tienen una respuesta adaptativa para poder metabolizar las altas concentraciones del AP en las mitocondrias o incluso en los peroxisomas [246]. Las neuronas contienen peroxisomas capaces de metabolizar ácidos grasos de cadena larga. Por lo tanto, una posibilidad es que las neuronas al tener una β -oxidación mitocondrial poco eficiente, este catabolismo podría llevarse a cabo en los peroxisomas.

La activación del metabolismo energético neuronal por parte del AP también fue demostrada al observar que el MP redujo el consumo de glucosa, pero no los niveles de NAD^+ a los tiempos analizados. El MP es un éster metílico de ácido graso que puede ser sintetizado de manera endógena por las células mediante las enzimas conocidas como sintasas de ésteres etílicos de ácidos grasos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el metabolismo del MP en tejidos periféricos y son nulos en sistema nervioso central. En células provenientes del carcinoma de Ehrlich y en una línea celular de hepatoma se caracterizó la cinética de internalización del MP y se observó que principalmente se incorpora a la membrana celular. Adicionalmente, se propone que para poder metabolizarse, el MP necesita ser hidrolizado para liberarse al citoplasma y así internalizarse a la mitocondria para ser oxidado [247, 248]. Sin embargo, una fracción de estos compuestos derivados de los ácidos grasos, al ser hidrolizados, se reesterifican en derivados del colesterol [248] lo que reduce la disponibilidad para utilizarse en el metabolismo energético. Estas características bioquímicas del MP podrían ser la razón por la cual se observa una reducción en el consumo de glucosa pero no una disminución en el índice NAD^+/NADH a los tiempos analizados. En este sentido, los resultados del análisis del transcriptoma neuronal tras la exposición al AP también revelaron que mediante la activación de múltiples vías involucradas en metabolismo de lípidos y energético las neuronas son capaces de responder ante este estímulo activando la β -oxidación. Los resultados en este trabajo y en otros publicados por el laboratorio aportan suficiente evidencia para reconocer que cuando los SFA se encuentran en altas concentraciones pueden ser usados como moléculas energéticas por las neuronas.

Adicional a esto, los resultados del GSEA señalaron que, además de los procesos asociados a metabolismo de lípidos, otras vías metabólicas importantes responden al AP como FOXO, PI3K-Akt, la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos y el metabolismo del colesterol. Diferentes grupos han reportado efectos similares del AP en múltiples modelos celulares al utilizar RNAseq o microarreglos [224, 225, 232, 249, 250]. En estos estudios se muestra la alteración de genes involucrados en la vía de PPAR, degradación de ácidos grasos, vía de quimiocinas, vías inflamatorias, β -oxidación, señalización mediada por insulina, entre otros. Los resultados del GSEA se suman y apoyan a la evidencia de trabajos previos del laboratorio que demuestran la resistencia a la insulina generada a través de múltiples mecanismos por exposición al AP en un modelo de neuronas humanas [83, 134].

Este mismo análisis del transcriptoma, a través del GSEA de KEGG *pathways* mostró que una de las vías de respuesta que las neuronas activan ante el AP, es la de IL-17. Esta es parte de la respuesta

proinflamatoria, principalmente caracterizada en macrófagos y células tipo T [251–253], y recientemente en neuronas hipotalámicas [254, 255]. La familia de factores de transcripción de NF- κ B, a la cual p65 pertenece, está estrechamente relacionada con la regulación de esta vía, así como de algunas otras mostradas en el GSEA como p53, MAPK y PPAR [84, 179, 254, 256–258]. De manera interesante, el incremento que encontramos en la acetilación de p65 tras la exposición al AP en neuronas y la aparición de las vías mencionadas en el GSEA, sugiere que la activación de este factor de transcripción podría impactar en estas vías. Por otro lado, en diferentes tipos celulares como células epiteliales, macrófagos y hepatocitos el AP puede activar la respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes del TLR4, activando a p65, adicionando otro mecanismo por el cual se puede inducir la respuesta inflamatoria [259, 260]. Varios de los mecanismos mencionados también pueden estimular la respuesta inflamatoria dependiente del inflammasoma NLRP3 [261]. En una línea celular de neuronas de hipocampo (HT22) y en el hipocampo de ratones con diabetes inducida por un tratamiento de streptozotocina, el inflammasoma juega un papel importante en la maduración y secreción de interleucinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 [261, 262], así como de moléculas implicadas en la formación de poros, como las Gasderminas, para liberar mediadores inflamatorios o incluso inducir apoptosis dependiente de inflamación [261, 263]. El inflammasoma no solo puede ser activado a través de p65, sino también por estímulos externos que generan estrés del ER, disfunción mitocondrial y/o incremento en las ROS [260, 261, 264]. De manera interesante, los resultados del análisis de transcriptoma muestran que algunos procesos asociados a estos mecanismos se alteran y son responsivos en las neuronas expuestas al AP.

El hinchamiento citoplásmico y neurítico debido al flujo de iones es otra de las respuestas que se ha reportado ante la activación del inflammasoma. En diferentes modelos de diabetes, de la EA y en neuronas expuestas a AP se caracterizó un patrón discontinuo en las neuritas similar al observado con la inmunodetección de MAP2, acompañado de segmentos gruesos alternados con segmentos delgados que sugieren hinchamiento localizado y eventos iniciales de distrofia dendrítica y axonal, así como de neuroinflamación [265–268]. Dado que el GSEA muestra que algunos de estos mecanismos se alteran en las neuronas hipocámpales expuestas al AP, esto podría explicar el posible hinchamiento dendrítico observado con la distribución alterada, discontinua y localizada de MAP2. El análisis de estos datos sugiere que las neuronas responden a la presencia de una alta concentración de AP a través de múltiples componentes inflamatorios y apoya la hipótesis del daño neuronal crónico-inflamatorio asociado al consumo de dietas altas en SFA.

Las alteraciones metabólicas y en el impacto en los mecanismos de inflamación observados en este modelo neuronal, se pueden asociar a la desregulación en la función y cantidad de proteínas como SIRT1, p65, BACE1 y PPAR. Estas proteínas y enzimas juegan un papel importante en estos procesos y que, de manera interesante, se han visto implicadas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Adicional al papel en el metabolismo energético, el NAD⁺ es un sustrato muy importante para algunas familias de enzimas, que vincula al sistema redox con la regulación de múltiples procesos dependientes de estas enzimas. Este y otros trabajos asocian los cambios en el contenido del NAD⁺ intracelular con la disminución en la actividad de desacetilasa de SIRT1 [151, 269, 270]. Sin embargo, en el presente trabajo también se encontró una reducción en la cantidad de proteína y un aumento en su mRNA. Por lo que la reducción en la actividad puede deberse tanto a la falta del NAD⁺ como a la reducción en los niveles proteicos. Por un lado, cuando las neuronas son expuestas al AP se genera estrés oxidante y la activación de JNK [110, 140]. La activación de JNKs favorece la degradación de SIRT1 vía proteosoma en condiciones metabólicas, como la obesidad [271–273]. En consecuencia y para compensar esta pérdida, la neurona podría estar aumentando la síntesis a través de la sobreexpresión del transcrito [274], como se encontró en este trabajo. De manera interesante, el promotor de *Sirt1* contiene sitios de unión para p65 que poseen actividad promotora generando un mecanismo de retroalimentación positiva [275]. Cuando hay bajos niveles de SIRT1, se activa p65 y se aumenta la transcripción del gen *Sirt1*. En las neuronas hipocámpales expuestas a AP se aumentó la actividad de p65, medido por el incremento en la K310ac, y

por lo tanto este mecanismo podría estar involucrado en el aumento significativo del mRNA de *Sirt1* observado. Otro mecanismo que podría estar involucrado es la regulación a través del *miR-132* [276]. Entre los blancos de este miRNA se encuentra el transcrito de *Sirt1*. De manera interesante, el análisis del RNAseq de las neuronas de hipocampo tratadas con AP muestra que el *miR-132* es uno de los DEGs (Tabla 4). El *miR-132* se altera en condiciones metabólicas, en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas [276–278], por lo que este mecanismo podría ser un elemento importante a estudiar en el modelo de neuronas de hipocampo sometidas al AP.

Los cambios observados en los niveles de proteína y mRNA de SIRT1 podrían estar impactando en múltiples mecanismos, como en la regulación transcripcional dependiente de diferentes factores de transcripción. En este sentido, existe evidencia sobre el papel de SIRT1 en la regulación de genes que codifican para enzimas del procesamiento amiloidogénico de la APP, a través de la desacetilación de factores de transcripción [209, 213]. Marwarha *et al.* reportaron la inducción de BACE1 en células de neuroblastoma tratadas con AP a través del factor de transcripción asociado al estrés del RE (CHOP) [214]. De manera interesante, los resultados de este trabajo también demuestran un incremento de BACE1, posiblemente asociado con la activación de otro factor de transcripción, p65, dependiente de una disminución en la actividad y contenido de SIRT1 como consecuencia de la exposición al AP. Es importante recalcar que SIRT1 al desacetilar la lisina 310 de p65 inhibe su localización nuclear y, por lo tanto, su actividad como factor de transcripción [187]. Dado esto, se propone un modelo en el que la reducción en la actividad de SIRT1 evidenciada por el aumento en la acetilación de la K310 de p65, permite la activación y reclutamiento de p65 al promotor de *Bace1* generando un aumento en la transcripción de este gen. Dicha propuesta la sustentan algunos reportes que evidencian a p65 como un regulador transcripcional importante de *Bace1* [279–281].

Complementando estos hallazgos, hay un cambio en la distribución espacial de BACE1 el cual es fundamental para la producción de A β [281, 282]. Además la S-palmitoilación de BACE1 juega un papel importante para su compartimentalización y tráfico intracelular hacia las terminales sinápticas [283], por lo que es posible que el cambio en la localización que observamos pudiera depender de esta PTM, en donde cantidades elevadas de AP podrían exacerbar la S-palmitoilación, favoreciendo la localización de BACE1 a las terminales sinápticas donde lleva a cabo la actividad enzimática que promueve la vía amiloidogénica. La producción incrementada de A β es un mecanismo propuesto para el desarrollo de la EA [202, 204]. En este sentido, el análisis del transcriptoma a través del GSEA señala que tras la exposición al AP se genera una alteración en procesos propios de las neuronas donde se presume que BACE1 juega un papel importante como la LTP y la regulación en los niveles de neurotransmisores [284–286]. Dichos procesos se desregulan durante el envejecimiento y la EA, lo cual pone en evidencia al AP como un factor de riesgo que, a través de la desregulación de BACE1, genera alteraciones en estos mecanismos implicados en enfermedades neurodegenerativas.

Otra familia de factores de transcripción importante a considerar en los resultados presentados es la familia de PPAR, ya que diferentes ácidos grasos pueden unirse a ellos para regular múltiples vías relacionadas con lípidos [84], pueden ser modulados por SIRT1 [15, 16] y estos a su vez pueden regular la transcripción de *Bace1* [16]. Por ejemplo, en células HepG2 el AP y el MUFA, ácido oleico, se unen y activan específicamente a PPAR α y PPAR γ de una manera tiempo y concentración dependiente [100]. Para comprobar algunos de los resultados obtenidos con el análisis funcional, se evaluaron 4 genes involucrados en el metabolismo de lípidos y el metabolismo energético mediante qRT-PCR. El transcrito del gen *Hmgcs2* se encontró incrementado significativamente cuando las neuronas son tratadas con AP. Este gen codifica para la Hidroximetilglutaril-CoA sintasa, enzima importante en la síntesis de cuerpos cetónicos. La síntesis de los cuerpos cetónicos es una vía metabólica que, principalmente, se activa en condiciones de ayuno donde el cuerpo necesita utilizar ácidos grasos para la producción de energía [30]. En esta ruta metabólica, la enzima mitocondrial *Hmgcs2* se activa en presencia de acetil-CoA y cataliza la primera reacción de la cetogénesis, siendo el paso limitante. En estas condiciones, la acetil-CoA es un

producto que principalmente proviene de la β -oxidación mitocondrial. *Angptl4* también se encuentra sobre-expresado en las neuronas expuestas a AP. Este gen codifica a una hormona sérica que está directamente involucrada en la regulación del metabolismo lipídico [287]. De manera interesante, una de las vías importantes para la regulación transcripcional de ambos genes es la de PPAR [288]. Por lo que se sugiere que el aumento en el mRNA de los dos genes apunta a la activación de la vía de PPAR ante el estímulo del AP en neuronas de hipocampo.

Los otros dos genes que se cuantificaron por qRT-PCR también son importantes para el metabolismo de lípidos. Sin embargo, no están regulados por la familia de factores de transcripción PPAR. *Ugt8* [289] se encontró con una tendencia a disminuir su expresión mientras que *Rnf145* [290] se observó sub-expresado en las neuronas expuestas al AP. UGT8 es una enzima cerebral clave para la síntesis de los galactocerebrósidos.[291, 292] Por otro lado, RNF145 es una E3 ubiquitín ligasa que recientemente se ha empezado a caracterizar y la información es escasa. Sin embargo, está involucrada en mantener la homeostasis del colesterol, regulando de forma negativa el proceso cuando hay altos niveles de la proteína en la célula.[293, 294] El hecho de que su mRNA se encuentre sub-expresado sugiere que hay un incremento en los niveles de colesterol a través de la síntesis *de novo*. [293] En conjunto, la cuantificación de los 4 genes por qRT-PCR podría indicar que la vía de PPAR es de gran importancia para la regulación de la respuesta de las neuronas expuestas a altas concentraciones de AP.

8. CONCLUSIONES

La actividad del metabolismo de lípidos en neuronas sigue siendo un tema controversial, y los experimentos realizados en el presente trabajo proveen evidencia de algunos mecanismos a través de los cuales las neuronas hipocampales responden al AP. En este sentido, la reducción en el consumo de glucosa y del índice $NAD^+/NADH$, así como los resultados obtenidos en el GSEA y en otros trabajos del laboratorio, señalan que este SFA afecta de forma importante procesos del metabolismo energético, como la vía de señalización de la insulina y la β -oxidación. Adicional a lo anterior, se demostró la activación de p65, a través de la inactivación de SIRT1, apuntando a la participación de componentes inflamatorios, caracterizados en otros tejidos, y que también se activan en las neuronas hipocampales ante el estímulo del AP. Estos componentes parecen, además, estar involucrados en la regulación de la transcripción de genes importantes para la generación de marcadores de neurodegeneración, como es la producción del A β . De esta forma se sugiere un mecanismo adicional a través del metabolismo energético y de un factor de transcripción asociado a inflamación, p65, capaz de mediar el aumento de BACE1 y su localización hacia las terminales sinápticas.

Por primera vez se presenta la integración de los efectos nocivos del AP sobre las neuronas utilizando análisis masivos de transcriptoma, redes de interacción y GSEA. Estos análisis sugieren que en condiciones crónicas de exposición al AP se podrían alterar procesos asociados con memoria, aprendizaje e integridad neuronal, como la LTP, la regulación en los niveles de neurotransmisores y el recubrimiento axonal. Adicionalmente, se muestra una desregulación en múltiples procesos celulares generales asociados con la senescencia y la neurodegeneración, como la muerte neuronal. Todos estos mecanismos evidenciados por el análisis del RNAseq están implicados en la variedad de efectos reportados por el consumo excesivo de AP y de HFD, abriendo la posibilidad de iniciar nuevos proyectos y abordar más preguntas para continuar explorando los mecanismos por los que se afectan las neuronas. Entre algunas de estas preguntas destacan las siguientes:

- ¿Existe un reclutamiento diferencial de factores de transcripción que pueden ser modulados por el mismo ácido graso?

- ¿Cuáles son cambios nucleares y los mecanismos epigenéticos neuronales que se alteran ante la exposición a SFA?
- ¿Qué mecanismos celulares, como la estabilidad de los mRNAs, son afectados por la alteración de los RNA no codificantes identificados en el análisis del RNAseq?
- ¿Cómo se modulan los elementos de los diferentes componentes inflamatorios y del metabolismo de lípidos?
- ¿Qué mecanismos se activan/desactivan cuando las neuronas expuestas AP reducen el consumo de glucosa?
- ¿Cómo se afecta la función sináptica y los procesos importantes para esta, como la LTP y la neurotransmisión, ante la exposición del AP?

Respecto a algunas de estas preguntas se comenzaron a realizar experimentos preliminares para continuar caracterizando los mecanismos que se afectan (Anexo 3).

En conjunto, los resultados de la presente tesis muestran por primera vez la activación del metabolismo energético neuronal en presencia de una concentración elevada de SFA y las consecuencias de la integración de los efectos pleiotrópicos del AP, poniendo en evidencia el papel de los SFA como factor de riesgo para patologías crónico-degenerativas del sistema nervioso central.

9. REFERENCIAS

1. Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, et al (2014) Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1001–8. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>
2. Tramutola A, Triplett JC, Di Domenico F, et al (2015) Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): Analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. *J Neurochem* 133:739–749. <https://doi.org/10.1111/jnc.13037>
3. Sinclair KJ, Friesen-Waldner LJ, Mccurdy CM, et al (2018) Quantification of fetal organ volume and fat deposition following in utero exposure to maternal Western Diet using MRI. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192900>
4. Pifferi F, Terrien J, Marchal J, et al Caloric restriction increases lifespan but affects brain integrity in grey mouse lemur primates. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0024-8>
5. Cordain L, Eaton B, Sebastian A, et al (2005) Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century 1,2
6. Hambly C, Speakman JR (2005) Contribution of different mechanisms to compensation for energy restriction in the mouse. *Obes Res* 13:1548–1557. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.190>
7. Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, et al (2003) Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 88:16–23. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020405>
8. Pifferi F, Terrien J, Marchal J, et al (2018) Caloric restriction increases lifespan but affects brain integrity in grey mouse lemur primates. *Commun Biol* 1:. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0024-8>
9. Lee S, Min K (2013) Caloric restriction and its mimetics. 6696:
10. Fontana L, Partridge L (2015) Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell* 161:106–118
11. Kenyon C, Chang J, Gensch E, et al (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461–464. <https://doi.org/10.1038/366461a0>
12. Kapahi P, Zid BM, Harper T, et al (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol* 14:885–890. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.059>
13. Sharma N, Castorena CM, Cartee GD (2012) Tissue-specific responses of IGF-1/insulin and mTOR signaling in calorie restricted rats. *PLoS One* 7:38835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038835>
14. Stenesen D, Suh JM, Seo J, et al (2013) Adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies. *Cell Metab* 17:101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.006>
15. Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, et al (2010) Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol Cell Biochem* 339:285–292. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0391-z>
16. Wang R, Li JJ, Diao S, et al (2013) Metabolic Stress Modulates Alzheimer's β -Secretase Gene Transcription via SIRT1-PPAR γ -PGC-1 in Neurons. *Cell Metab* 17:685–694. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.016>
17. Ma L, Dong W, Wang R, et al (2015) Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. *Brain Res Bull* 116:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.06.004>
18. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO (2004) Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6659–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308291101>
19. Willcox DC, Willcox BJ, Todoriki H, et al (2006) Caloric restriction and human longevity: What can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* 7:173–177
20. Heilbronn LK, De Jonge L, Frisard MI, et al (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 295:1539–1548. <https://doi.org/10.1001/jama.295.13.1539>
21. Redman LM, Smith SR, Burton JH, et al (2018) Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metab* 27:805-815.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.019>
22. Więckowska-Gacek A, Mietelska-Porowska A, Wydrych M, Wojda U (2021) Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 101397.

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101397>

23. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al (2012) Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 15:848–860. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>
24. Yoon G, Cho KA, Song J, Kim YK (2019) Transcriptomic analysis of high fat diet fed mouse brain cortex. *Front Genet* 10:1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00083>
25. Kahle M, Schäfer A, Seelig A, et al (2015) High fat diet-induced modifications in membrane lipid and mitochondrial-membrane protein signatures precede the development of hepatic insulin resistance in mice. *Mol Metab* 4:39–50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.11.004>
26. Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, et al (2019) High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Front Cell Neurosci* 13:. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00509>
27. Reginato A, Siqueira BP, Miyamoto JÉ, et al (2020) Acute effects of fatty acids on autophagy in NPY neurones. *J Neuroendocrinol* 32:. <https://doi.org/10.1111/jne.12900>
28. Saiyasis N, Chunchai T, Apaijai N, et al (2020) Chronic high-fat diet consumption induces an alteration in plasma/brain neurotensin signaling, metabolic disturbance, systemic inflammation/oxidative stress, brain apoptosis, and dendritic spine loss. *Neuropeptides* 82:. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2020.102047>
29. Alkan I, Altunkaynak BZ, Gültekin Gİ, Bayçu C (2021) Hippocampal neural cell loss in high-fat diet-induced obese rats—exploring the protein networks, ultrastructure, biochemical and bioinformatical markers. *J Chem Neuroanat* 114:. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2021.101947>
30. Nelson DL, Cox MM (2008) Lehninger Principles of biochemistry 5th ed. In: Co WHF& (ed) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed. Division of Chemical Education, pp 631–652
31. Rapoport S, Purdon D, Shetty H, et al (1997) In vivo imaging of fatty acid incorporation into brain to examine signal transduction and neuroplasticity involving phospholipids. *Ann N Y Acad Sci* 820:56–74. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1997.TB46189.X>
32. Smith Q, Nagura H (2001) Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *J Mol Neurosci* 16:167–72; discussion 215. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:167>
33. Hamilton JA, Brunaldi K (2007) A Model for Fatty Acid Transport into the Brain. *J Mol Neurosci* 33:12–17. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0050-3>
34. Yassine HN, Johnson L, Plourde M, et al (2021) Lipid Transport and Metabolism at the Blood-Brain Interface: Implications in Health and Disease. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.645646>
35. Dhopeshwarkar G, Mead J (1973) Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. *Adv Lipid Res* 11:109–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-024911-4.50010-6>
36. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA (2009) Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Pap Press*. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800085-JLR200>
37. Dehouck B, Fenart L, Dehouck M, et al (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138:877–889. <https://doi.org/10.1083/JCB.138.4.877>
38. Yuen Hui T, Bernlohr DA (1997) FATTY ACID TRANSPORTERS IN ANIMAL CELLS. *Front Biosci* 2:222
39. Shimabukuro MK, Langhi LGP, Cordeiro I, et al (2016) Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes. *Sci Rep* 6:23795. <https://doi.org/10.1038/SREP23795>
40. Ioannou M, Jackson J, Sheu S, et al (2019) Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell* 177:1522-1535.e14. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.04.001>
41. Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
42. Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, Dokmeci Emre S (2017) Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids Health Dis* 16:. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>
43. Liu L, Zhang K, Sandoval H, et al (2015) Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* 160:177–190. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.12.019>
44. Liu L, MacKenzie K, Putluri N, et al (2017) The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab* 26:719-737.e6.

<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.08.024>

45. Fatima S, Hu X, Gong RH, et al (2019) Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development. *Cell Mol Life Sci* 76:2547–2557. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03092-7>
46. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M (2018) Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 29:178–190. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>
47. Boden G, Shulman GI (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: Defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.*
48. Delarue J, Magnan C (2007) Free fatty acids and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*
49. Kurotani K, Sato M, Ejima Y, et al (2012) High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr Res.* <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.004>
50. Melo H, da Seixas da Silva GS, Ramos Sant M, et al (2020) Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α In Brief. *Cell Rep* 30:2180–2194. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.072>
51. Kivimäki M, Luukkonen R, Batty G, et al (2018) Body mass index and risk of dementia: Analysis of individual-level data from 1.3 million individuals. *Alzheimers Dement* 14:601–609. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2017.09.016>
52. Chatterjee S, Peters SAE, Woodward M, et al (2016) Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. *Diabetes Care* 39:300. <https://doi.org/10.2337/DC15-1588>
53. Albanese E, Launer L, Egger M, et al (2017) Body mass index in midlife and dementia: Systematic review and meta-regression analysis of 589,649 men and women followed in longitudinal studies. *Alzheimer's Dement (Amsterdam, Netherlands)* 8:165–178. <https://doi.org/10.1016/J.DADM.2017.05.007>
54. Singh-Manoux A, Dugravot A, Shipley M, et al (2018) Obesity trajectories and risk of dementia: 28 years of follow-up in the Whitehall II Study. *Alzheimers Dement* 14:178–186. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2017.06.2637>
55. Fraser T, Tayler H, Love S (2009) Fatty Acid Composition of Frontal, Temporal and Parietal Neocortex in the Normal Human Brain and in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 2009 353 35:503–513. <https://doi.org/10.1007/S11064-009-0087-5>
56. Patil S, Chan C (2005) Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 384:288–293. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.05.003>
57. Maesako M, Uemura K, Kubota M, et al (2012) Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol Aging* 33:1011.e11-1011.e23. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.028>
58. Vandal M, White PJ, Tremblay C, et al (2014) Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes* 63:4291–4301. <https://doi.org/10.2337/db14-0375>
59. Maesako M, Uemura M, Tashiro Y, et al (2015) High fat diet enhances β -site cleavage of amyloid precursor protein (APP) via promoting β -site APP cleaving enzyme 1/adaptor protein 2/clathrin complex formation. *PLoS One* 10:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131199>
60. Kim J, Lee H, Lee S, et al (2017) Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid- β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 α and Akt/NF- κ B pathways. *Sci Rep* 7:. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-04175-W>
61. Nakandakari SCBR, Muñoz VR, Kuga GK, et al (2019) Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav Immun* 79:284–293. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.02.016>
62. Phitthayaphong P, Kumfu S, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2021) Blockage of Fc Gamma Receptors Alleviates Neuronal and Microglial Toxicity Induced by Palmitic Acid. *J Alzheimers Dis* 82:1315–1332. <https://doi.org/10.3233/JAD-210417>
63. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al (2020) Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396:413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
64. Cohen J, JD H, Hobbs H (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332:1519–1523. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1204265>
65. Horton J, Goldstein J, Brown M (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in

the liver. *J Clin Invest* 109:1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>

66. Uyeda K, Repa JJ (2006) Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4:107–110. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2006.06.008>
67. Burdge G (2006) Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:161–168. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2006.05.013>
68. Carta G, Murru E, Lisai S, et al (2015) Dietary Triacylglycerols with Palmitic Acid in the sn-2 Position Modulate Levels of N-Acylethanolamides in Rat Tissues. *PLoS One* 10:e0120424. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0120424>
69. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 9:112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
70. Schmid P, Deli E, Schmid H (1995) Generation and remodeling of phospholipid molecular species in rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 319:168–176. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1995.1279>
71. Linder M, Deschenes R (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:74–84. <https://doi.org/10.1038/NRM2084>
72. Fukata Y, Fukata M (2010) Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2010 11:161–175. <https://doi.org/10.1038/nrn2788>
73. Yang W, Di Vizio D, Kirchner M, et al (2010) Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Mol Cell Proteomics* 9:54–70. <https://doi.org/10.1074/MCP.M800448-MCP200>
74. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 11 1:31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
75. Greaves J, Chamberlain L (2007) Palmitoylation-dependent protein sorting. *J Cell Biol* 176:249–254. <https://doi.org/10.1083/JCB.200610151>
76. El-Husseini AE-D, Bredt DS (2002) Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat Rev Neurosci* 2002 310 3:791–802. <https://doi.org/10.1038/nrn940>
77. Merrill A, Wang E, Mullins R (1988) Kinetics of long-chain (sphingoid) base biosynthesis in intact LM cells: effects of varying the extracellular concentrations of serine and fatty acid precursors of this pathway. *Biochemistry* 27:340–345. <https://doi.org/10.1021/BI00401A051>
78. Holland W, Brozinick J, Wang L, et al (2007) Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5:167–179. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.01.002>
79. Kogot-Levin A, Saada A (2014) Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* 100:88–94. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2013.07.027>
80. Schmitz-Peiffer C, Craig D, Biden T (1999) Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274:24202–24210. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.34.24202>
81. Zhou H, Summers S, Birnbaum M, Pittman R (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273:16568–16575. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.26.16568>
82. Holland WL, Bikman BT, Wang L-P, et al (2011) Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 121:1858–1870. <https://doi.org/10.1172/JCI43378>
83. Sánchez-Alegría K, Bastián-Eugenio C, Vaca L, Arias C (2021) Palmitic acid induces insulin resistance by a mechanism associated with energy metabolism and calcium entry in neuronal cells. *FASEB J* 35:. <https://doi.org/10.1096/FJ.202100243R>
84. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1812:1007–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>
85. Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA (2014) Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr* 34:281–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161220>
86. Glatz JFC, Luiken JJFP (2018) Thematic Review Series: Lipid Transfer Proteins Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization thematic review series. *J Lipid Res* 59:1084–1093. <https://doi.org/10.1194/jlr.R082933>

87. El-Yassimi A, Hichami A, Besnard P, Khan N (2008) Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* 283:12949–12959. <https://doi.org/10.1074/JBC.M707478200>
88. Magnan C, Levin B, Luquet S (2015) Brain lipid sensing and the neural control of energy balance. *Mol Cell Endocrinol* 418 Pt 1:3–8. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.09.019>
89. Kuda O, Jenkins C, Skinner J, et al (2011) CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2. *J Biol Chem* 286:17785–17795. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.232975>
90. Abdoul-Azize S, Selvakumar S, Sadou H, et al (2014) Ca²⁺ signaling in taste bud cells and spontaneous preference for fat: Unresolved roles of CD36 and GPR120. *Biochimie* 96:8–13. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2013.06.005>
91. Edler M, Johnson C, Ahmed H, Richardson J (2021) Age, sex, and regional differences in scavenger receptor CD36 in the mouse brain: Potential relevance to cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 529:2209–2226. <https://doi.org/10.1002/CNE.25089>
92. Ricciarelli R, D'Abramo C, Zingg J, et al (2004) CD36 overexpression in human brain correlates with beta-amyloid deposition but not with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 36:1018–1024. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.01.007>
93. Park L, Wang G, Zhou P, et al (2011) Scavenger receptor CD36 is essential for the cerebrovascular oxidative stress and neurovascular dysfunction induced by amyloid-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5063–5068. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1015413108>
94. Wu B, Ueno M, Kusaka T, et al (2013) CD36 expression in the brains of SAMP8. *Arch Gerontol Geriatr* 56:75–79. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHGER.2012.07.007>
95. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al (2003) The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids. *J Biol Chem* 278:11303–11311. <https://doi.org/10.1074/JBC.M211495200>
96. Nakamoto K, Nishinaka T, Matsumoto K, et al (2012) Involvement of the long-chain fatty acid receptor GPR40 as a novel pain regulatory system. *Brain Res* 1432:74–83. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.11.012>
97. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nat* 2003 4226928 422:173–176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
98. Towers A, Oelschlager M, Juda M, et al (2020) HFD refeeding in mice after fasting impairs learning by activating caspase-1 in the brain. *Metabolism* 102:. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2019.153989>
99. Engel D, Bobbo V, Solon C, et al (2020) Activation of GPR40 induces hypothalamic neurogenesis through p38- and BDNF-dependent mechanisms. *Sci Rep* 10:. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-68110-2>
100. Popeijus HE, van Otterdijk SD, van der Krieken SE, et al (2014) Fatty acid chain length and saturation influences PPAR α transcriptional activation and repression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 58:2342–2349. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400314>
101. Silva-Santi LG da, Antunes MM, Mori MA, et al (2018) Brain Fatty Acid Composition and Inflammation in Mice Fed with High-Carbohydrate Diet or High-Fat Diet. *Nutrients* 10:. <https://doi.org/10.3390/NU10091277>
102. Ly LD, Xu S, Choi S-K, et al (2017) Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med*. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.157>
103. Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M (2015) Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Arch Biochem Biophys*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.009>
104. Barlow J, Jensen VH, Jastroch M, Affourtit C (2016) Palmitate-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion precedes mitochondrial dysfunction in mouse pancreatic islets. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/BJ20151080>
105. Zeng X, Zhu M, Liu X, et al (2020) Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr Metab (Lond)*. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-0434-8>
106. Kwon CH, Sun JL, Jeong JH, Jung TW (2020) Humanin attenuates palmitate-induced hepatic lipid accumulation and insulin resistance via AMPK-mediated suppression of the mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.128>
107. Woodworth-Hobbs ME, Perry BD, Rahner JA, et al (2017) Docosahexaenoic acid counteracts palmitate-induced endoplasmic reticulum stress in C2C12 myotubes: Impact on muscle atrophy. *Physiol Rep* 5:e13530. <https://doi.org/10.14814/PHY2.13530>

108. Mayer C, Belsham D (2010) Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151:576–585. <https://doi.org/10.1210/EN.2009-1122>
109. Sun Y, Wang J, Guo X, et al (2021) Oleic Acid and Eicosapentaenoic Acid Reverse Palmitic Acid-induced Insulin Resistance in Human HepG2 Cells via the Reactive Oxygen Species / JUN Pathway. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2019.06.005>
110. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L (2010) Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:1096–1105. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00238.2010.-The>
111. Erion DM, Shulman GI (2010) C O M M E N T A R Y Diacylglycerol-mediated insulin resistance Lipid-induced liver insulin resistance A similar mechanism for diacylglycerol-induced insulin resistance operates in the liver (Fig. 1b). Short-term high-fat feeding of rats. *Nat Publ Gr* 16:. <https://doi.org/10.1038/nm0410-400>
112. Nisir R, Shah D, Hundal H (2020) Mono- and Polyunsaturated Fatty Acids Counter Palmitate-Induced Mitochondrial Dysfunction in Rat Skeletal Muscle Cells. *Cell Physiol Biochem* 54:975–993. <https://doi.org/10.33594/000000282>
113. Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, et al (2008) Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin Resistance and Inflammation in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 283:11107–11116. <https://doi.org/10.1074/JBC.M708700200>
114. Vandamagsar B, Youm Y, Ravussin A, et al (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17:179–189. <https://doi.org/10.1038/NM.2279>
115. Szpigel A, Hainault I, Carlier A, et al (2018) Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 61:399–412. <https://doi.org/10.1007/S00125-017-4462-5>
116. Cheng L, Yu Y, Szabo A, et al (2015) Palmitic acid induces central leptin resistance and impairs hepatic glucose and lipid metabolism in male mice. *J Nutr Biochem* 26:541–548. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2014.12.011>
117. Mansuri M, Sharma G, Parihar P, et al (2021) Increased oxidative stress and mitochondrial impairments associated with increased expression of TNF- α and caspase-3 in palmitic acid-induced lipotoxicity in myoblasts. *J Biochem Mol Toxicol* 35:. <https://doi.org/10.1002/JBT.22744>
118. Bagherieh M, Kheirollahi A, Zamani-Garmsiri F, et al (2021) Folic acid ameliorates palmitate-induced inflammation through decreasing homocysteine and inhibiting NF- κ B pathway in HepG2 cells. *Arch Physiol Biochem*. <https://doi.org/10.1080/13813455.2021.1878539>
119. Takahashi K, Yamaguchi S, Shimoyama T, et al (2008) JNK- and I κ B-dependent pathways regulate MCP-1 but not adiponectin release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00131.2007>
120. Guo W, Wong S, Xie W, et al (2007) Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00523.2006>
121. Mukhuty A, Fouzder C, Kundu R (2021) Fetuin-A excess expression amplifies lipid induced apoptosis and β -cell damage. *J Cell Physiol* jcp.30499. <https://doi.org/10.1002/JCP.30499>
122. Mukhuty A, Fouzder C, Mukherjee S, et al (2017) Palmitate induced Fetuin-A secretion from pancreatic β -cells adversely affects its function and elicits inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 491:1118–1124. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.08.022>
123. Shen X, Yang L, Yan S, et al (2015) Fetuin A promotes lipotoxicity in β cells through the TLR4 signaling pathway and the role of pioglitazone in anti-lipotoxicity. *Mol Cell Endocrinol* 412:1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.05.014>
124. Ou H, Wu H, Hung H, et al (2012) Endoplasmic reticulum stress induces the expression of fetuin-A to develop insulin resistance. *Endocrinology* 153:2974–2984. <https://doi.org/10.1210/EN.2011-2043>
125. Bikman BT, Guan Y, Shui G, et al (2012) Fenretinide Prevents Lipid-induced Insulin Resistance by Blocking Ceramide Biosynthesis. *J Biol Chem* 287:17426. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.359950>
126. Watson M, Coghlan M, Hundal H (2009) Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem J* 417:791–801. <https://doi.org/10.1042/BJ20081149>
127. Turpin S, Nicholls H, Willmes D, et al (2014) Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 20:678–686. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2014.08.002>

128. Samuel VT, Shulman GI (2016) The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126:12–22. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>
129. Bergman BC, Hunerdosse DM, Kerege A, et al (2012) Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetology* 55:1140–1150. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2419-7>
130. Stratford S, Hoehn K, Liu F, Summers S (2004) Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 279:36608–36615. <https://doi.org/10.1074/JBC.M406499200>
131. Powell D, Hajduch E, Kular G, Hundal H (2003) Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 23:7794–7808. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7794-7808.2003>
132. Pardo V, González-Rodríguez Á, Muntané J, et al (2015) Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem Toxicol* 80:298–309. <https://doi.org/10.1016/j.FCT.2015.03.029>
133. Kwon B, Querfurth HW (2015) Palmitate activates mTOR/p70S6K through AMPK inhibition and hypophosphorylation of raptor in skeletal muscle cells: Reversal by oleate is similar to metformin. *Biochimie* 118:141–150. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2015.09.006>
134. Calvo-Ochoa E, Sánchez-Alegría K, Gómez-Inclán C, et al (2017) Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem Int*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>
135. Kopietz F, Rupar K, Berggreen C, et al (2020) Inhibition of AMPK activity in response to insulin in adipocytes: involvement of AMPK pS485, PDEs, and cellular energy levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 319:E459–E471. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00065.2020>
136. Hartogh DJ, Den, Vlacheski F, Giacca A, Tsiani E (2020) Attenuation of Free Fatty Acid (FFA)-Induced Skeletal Muscle Cell Insulin Resistance by Resveratrol is Linked to Activation of AMPK and Inhibition of mTOR and p70 S6K. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 4900 21:4900. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144900>
137. Nardi F, Lipina C, Magill D, et al (2014) Enhanced Insulin Sensitivity Associated with Provision of Mono and Polyunsaturated Fatty Acids in Skeletal Muscle Cells Involves Counter Modulation of PP2A. *PLoS Genet* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092255>
138. Du K, Herzig S, Kulkarni R, Montminy M (2003) TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300:1574–1577. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1079817>
139. Geng T, Hu W, Broadwater MH, et al Fatty acids differentially regulate insulin resistance through endoplasmic reticulum stress-mediated induction of tribbles homologue 3: a potential link between dietary fat composition and the pathophysiological outcomes of obesity. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2973-2>
140. Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW (2014) Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843:1402–1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.004>
141. Gustavo Vazquez-Jimenez J, Chavez-Reyes J, Romero-Garcia T, et al (2016) Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell Signal* 28:53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.001>
142. Kreutzenberg SV, De, Ceolotto G, Papparella I, et al (2010) Downregulation of the Longevity-Associated Protein Potential Biochemical Mechanisms. 59:. <https://doi.org/10.2337/db09-1187.S.V.d.K>
143. Verdin E (2015) NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science* (80-) 350:1208–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aac4854>
144. Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20070140>
145. Tanner K, Landry J, Sternglanz R, Denu J (2000) Silent information regulator 2 family of NAD⁻ dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14178–14182. <https://doi.org/10.1073/PNAS.250422697>
146. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14:528. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.08.014>
147. Haigis MC, Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*

- 20:2913–2921. <https://doi.org/10.1101/GAD.1467506>
148. Herskovits AZ, Guarente L (2013) Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Nat Publ Gr* 23:746–758. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.70>
 149. Kaerberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13:2570–2580. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.19.2570>
 150. Jiang J, Jaruga E, Repnevskaya M, Jazwinski S (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J* 14:2135–2137. <https://doi.org/10.1096/FJ.00-0242FJE>
 151. Imai S, Armstrong C, Kaerberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795–800. <https://doi.org/10.1038/35001622>
 152. Guarente L (1999) Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet* 1999 233 23:281–285. <https://doi.org/10.1038/15458>
 153. Langley E, Pearson M, Faretta M, et al (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21:2383. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/21.10.2383>
 154. Sorci L, Kurnasov O, Rodionov DA, Osterman AL (2010) Genomics and enzymology of NAD biosynthesis. *Compr Nat Prod II Chem Biol* 7:213–257. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00138-6>
 155. Poljsak B, Milišav I (2016) The NAD(+)-depletion theory of ageing: NAD(+) as the link between oxidative stress, inflammation, caloric restriction, exercise, DNA repair, longevity and health span. *Rejuvenation Res* 2015.1767. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1767>
 156. Houtkooper R, Cantó C, Wanders R, Auwerx J (2010) The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* 31:194–223. <https://doi.org/10.1210/ER.2009-0026>
 157. Borradaile NM, Watson A, Pickering JG (2011) Regeneration and Aging: Regulation by Sirtuins and the NAD+ Salvage Pathway. *Regen Nephrol* 289–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380928-5.10019-3>
 158. Yoshida M, Imai S ichiro (2018) Regulation of Sirtuins by Systemic NAD+ Biosynthesis. *Introd Rev Sirtuins Biol Aging, Dis* 7–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813499-3.00002-2>
 159. Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, et al (2014) Regulation of energy metabolism and mitochondrial function in skeletal muscle during lipid overfeeding in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 99:1254–1262. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4379>
 160. Fiorino E, Giudici M, Ferrari A, Crestani M (2014) Critical Review The Sirtuin Class of Histone Deacetylases : Regulation and Roles in Lipid Metabolism. *IUMB life* 1–11. <https://doi.org/10.1002/iub.1246>
 161. Aguilar-Arnal L, Katada S, Orozco-Solis R, Sassone-Corsi P (2015) NAD+-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1. *Nat Struct Mol Biol* 22:312–318. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2990>
 162. Sauve AA (2010) Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804:1591–1603. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.021>
 163. Rodgers J, Lerin C, Haas W, et al (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113–118. <https://doi.org/10.1038/NATURE03354>
 164. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nat* 2009 4587241 458:1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
 165. Noriega L, Feige J, Canto C, et al (2011) CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. *EMBO Rep* 12:1069–1076. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2011.151>
 166. Qin W, Yang T, Ho L, et al (2006) Neuronal SIRT1 Activation as a Novel Mechanism Underlying the Prevention of Alzheimer Disease Amyloid Neuropathology by Calorie Restriction *. *J Biol Chem* 281:21745–21754. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602909200>
 167. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al (2009) Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab* 9:327–338. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.02.006>
 168. Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, et al (2008) Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci* 28:9989–9996. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-08.2008>
 169. Zakhary SM, Ayubcha D, Dileo JN, et al (2010) Distribution Analysis of Deacetylase SIRT1 in Rodent and Human Nervous Systems. *Anat Rec (Hoboken)* 293:1024. <https://doi.org/10.1002/AR.21116>

170. Kim, H-J, Kim J, Noh S, et al (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res* 10:722–731. <https://doi.org/10.1021/PR100892R>
171. Cao K, Dong Y-T, Xiang J, et al (2018) Reduced expression of SIRT1 and SOD-1 and the correlation between these levels in various regions of the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Clin Pathol* 71:1090–1099. <https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2018-205320>
172. Sun C, Zhang F, Ge X, et al (2007) SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metab* 6:307–319. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.08.014>
173. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù M (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123:131–145. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2003.08.064>
174. Villapol S (2018) Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell Mol Neurobiol* 38:121–132. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0554-5>
175. Zolezzi JM, Santos MJ, Bastías-Candia S, et al (2017) PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol Rev* 92:2046–2069. <https://doi.org/10.1111/brv.12320>
176. Arturo F, Vitale RM (2012) Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs). <https://encyclopedia.pub/9191>. Accessed 28 Jul 2021
177. Heneka M, Klockgether T, Feinstein D (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci* 20:6862–6867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-06862.2000>
178. Kapadia R, Yi J, Vemuganti R (2008) Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci* 13:1813–1826. <https://doi.org/10.2741/2802>
179. An YQ, Zhang CT, Du Y, et al (2016) PPAR δ agonist GW0742 ameliorates A β 1–42-induced hippocampal neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis*. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9800-7>
180. Meng QQ, Feng ZC, Zhang XL, et al (2019) PPAR- γ Activation exerts an anti-inflammatory effect by suppressing the NLRP3 inflammasome in spinal cord-derived neurons. *Mediators Inflamm* 2019:. <https://doi.org/10.1155/2019/6386729>
181. Toledo E, Inestrosa N (2010) Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 15:272–285. <https://doi.org/10.1038/MP.2009.72>
182. Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, et al (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem* 282:37006–37015. <https://doi.org/10.1074/JBC.M700447200>
183. Inestrosa N, Godoy J, Quintanilla R, et al (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Exp Cell Res* 304:91–104. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2004.09.032>
184. Farokh Nezhad R, Nourbakhsh M, Razzaghy-Azar M, et al (2020) The effect of trans-palmitoleic acid on cell viability and sirtuin 1 gene expression in hepatocytes and the activity of peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha. *J Res Med Sci* 25:105. https://doi.org/10.4103/JRMS.JRMS_16_20
185. Deleye Y, Cotte A, Hannou S, et al (2020) CDKN2A/p16INK4a suppresses hepatic fatty acid oxidation through the AMPK α 2-SIRT1-PPAR α signaling pathway. *J Biol Chem* 295:17310–17322. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.012543>
186. Schug T, Xu Q, Gao H, et al (2010) Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol* 30:4712–4721. <https://doi.org/10.1128/MCB.00657-10>
187. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>
188. Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling. *J Biol Chem* 280:40364–40374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509329200>
189. Chung S, Kang B, Kim S, et al (2000) Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 275:32681–32687. <https://doi.org/10.1074/JBC.M002577200>
190. Ricote M, Li AC, Willson TM, et al (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nat* 1998 3916662 391:79–82. <https://doi.org/10.1038/34178>

191. Schönfeld P, Reiser G (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? - Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1493–1499. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
192. Edmond J, Robbins RA, Bergstrom JD, et al (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
193. Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, et al (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007>
194. Joyal JS, Sun Y, Gantner ML, et al (2016) Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.4059>
195. Jo YH, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S (2009) Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J Neurophysiol*. <https://doi.org/10.1152/jn.91294.2008>
196. Parker J, Arango M, Abderrahmane S, et al (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37:349–350. <https://doi.org/10.1038/NG1534>
197. Qin W, Yang T, Ho L, et al (2006) Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem* 281:21745–21754. <https://doi.org/10.1074/JBC.M602909200>
198. Kim D, Nguyen M, Dobbin M, et al (2007) SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26:3169–3179. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601758>
199. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y (2005) Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2alpha). *J Pharmacol Sci* 98:200–204. <https://doi.org/10.1254/JPHS.FMJ05001X2>
200. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, et al (2008) Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15599–15604
201. Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, et al (2007) Insulin Dysfunction Induces In Vivo Tau Hyperphosphorylation through Distinct Mechanisms. 27:13635–13648. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3949-07.2007>
202. Selkoe DJ (1996) Amyloid β -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease *. *J Biol Chem* 271:18295–18298. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.31.18295>
203. Lammich S, Kojro E, Postina R, et al (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922–3927. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.7.3922>
204. O'Brien R, Wong P (2011) Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 1987:185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613.Amyloid>
205. Vassar R (1999) Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* (80-). <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
206. Wang J, Fivecoat H, Ho L, et al (2010) The role of Sirt1: at the crossroad between promotion of longevity and protection against Alzheimer's disease neuropathology. *Biochim Biophys Acta* 1804:1690–1694. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.11.015>
207. Patel N, Gordon M, Connor K, et al (2005) Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol Aging* 26:995–1000. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.09.014>
208. Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L (2010) SIRT1 Suppresses β -Amyloid Production by Activating the α -Secretase Gene ADAM10. *Cell* 142:320–332. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.020>
209. Marwarha G, Raza S, Meiers C, Ghribi O (2014) Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- β genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1842:1587–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.015>
210. Calvo-Ochoa E, Arias C (2015) Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 31:1–13. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2531>
211. Schrijvers EMC, Witteman JCM, Sijbrands EJG, et al (2010) Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* 75:1982–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ffe4f6>

212. Chen Y, Deng Y, Zhang B, Gong C (2014) Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer ' s disease. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1408-x>
213. Cao L, Liu C, Wang F, Wang H (2013) SIRT1 negatively regulates amyloid-beta-induced inflammation via the NF-kB pathway. *Brazilian J Med Biol Res* 46:659–669. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132903>
214. Marwarha G, Rostad S, Lilek J, et al (2017) Palmitate Increases beta-site AbetaPP-Cleavage Enzyme 1 Activity and Amyloid-beta Genesis by Evoking Endoplasmic Reticulum Stress and Subsequent C/EBP Homologous Protein Activation. *J Alzheimer's Dis*
215. El Khoury NB, Gratuze M, Papon M-A, et al (2014) Insulin dysfunction and Tau pathology. *Front Cell Neurosci* 8:1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00022>
216. Min S, Cho S, Zhou Y, et al (2010) Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67:953–966. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.08.044>
217. Min S, Sohn P, Li Y, et al (2018) SIRT1 Deacetylates Tau and Reduces Pathogenic Tau Spread in a Mouse Model of Tauopathy. *J Neurosci* 38:3680–3688. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2369-17.2018>
218. Wang L, Shi F, Li N, et al (2020) AMPK Ameliorates Tau Acetylation and Memory Impairment Through Sirt1. *Mol Neurobiol* 57:5011–5025. <https://doi.org/10.1007/S12035-020-02079-X>
219. Wang Z, Zhu M, Wang M, et al (2021) Integrated Multiomic Analysis Reveals the High-Fat Diet Induced Activation of the MAPK Signaling and Inflammation Associated Metabolic Cascades via Histone Modification in Adipose Tissues. *Histone Modif Adipose Tissues Front Genet* 12:650863. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.650863>
220. Gao R, Fu Q, Jiang H-M, et al (2021) Temporal metabolic and transcriptomic characteristics crossing islets and liver reveal dynamic pathophysiology in diet-induced diabetes. *iScience*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102265>
221. Park SR, Cho C-S, Xi J, et al (2021) Holistic characterization of single-hepatocyte transcriptome responses to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320:E224–E258. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00391.2020>
222. Nyon Nam K, Mounier A, Wolfe CM, et al (2017) Effect of high fat diet on phenotype, brain transcriptome and lipidome in Alzheimer's model mice. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04412-2>
223. Breher-Esch S, Sahini N, Trincone A, et al (2018) Genomics of lipid-laden human hepatocyte cultures enables drug target screening for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0438-7>
224. Hall E, Volkov P, Dayeh T, et al (2014) Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med* 12:. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-103>
225. Grabiec K, Majewska A, Wicik Z, et al (2016) The effect of palmitate supplementation on gene expression profile in proliferating myoblasts. *Cell Biol Toxicol* 32:185–198. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9324-2>
226. Lyu P, Huang Z, Feng Q, et al (2020) Unveiling the transcriptome alteration of POMC neuron in diet-induced obesity. *Exp Cell Res* 389:111848. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111848>
227. Matsumura H, Miyachi S (1980) [43] Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides. *Methods Enzymol* 69:465–470. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(80\)69045-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(80)69045-4)
228. Mamada N, Tanokashira D, Hosaka A, et al (2015) Amyloid β -protein oligomers upregulate the β -secretase, BACE1, through a post-translational mechanism involving its altered subcellular distribution in neurons. *Mol Brain* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0163-5>
229. Flores Leon M (2016) Papel del metabolismo energético y la inhibición de Sirtuina 1 en la expresión de marcadores de la Enfermedad de Alzheimer. Universidad Nacional Autónoma de México
230. Musich R, Cadle-Davidson L, Osier M V. (2021) Comparison of Short-Read Sequence Aligners Indicates Strengths and Weaknesses for Biologists to Consider. *Front Plant Sci* 12:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.657240>
231. Seyednasrollah F, Laiho A, Elo LL (2015) Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief Bioinform* 16:59–70. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBT086>
232. Sargsyan E, Cen J, Roomp K, et al (2018) Identification of early biological changes in palmitate-treated isolated human islets. *BMC Genomics* 19:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5008-z>
233. Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:1–12. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-10-R106/COMMENTS>

234. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM (2017) RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS One* 12:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
235. Umegaki H (2010) Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 39:8–10. <https://doi.org/10.1093/ageing/afp211>
236. Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, et al (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: The Hisayama study. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181eee25f>
237. Contreras A, Del Rio D, Martínez A, et al (2017) Inhibition of hippocampal long-term potentiation by high-fat diets: Is it related to an effect of palmitic acid involving glycogen synthase kinase-3? *Neuroreport*. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000774>
238. Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al (2015) Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on health. *Molecules* 20:17339–17361. <https://doi.org/10.3390/molecules200917339>
239. Shi Y, Sun Y, Sun X, et al (2018) Up-regulation of HO-1 by Nrf2 activation protects against palmitic acid-induced ROS increase in human neuroblastoma BE(2)-M17 cells. *Nutr Res*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.02.003>
240. Sergi D, Morris AC, Kahn DE, et al (2018) Palmitic acid triggers inflammatory responses in N42 cultured hypothalamic cells partially via ceramide synthesis but not via TLR4. *Nutr. Neurosci*.
241. Thompson AL, Lim-Fraser MYC, Kraegen EW, Cooney GJ (2000) Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 279:577–584. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.3.e577>
242. Roden M (2004) How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 19:92–96. <https://doi.org/10.1152/NIPS.01459.2003>
243. Peng W, Tan C, Mo L, et al (2021) Glucose transporter 3 in neuronal glucose metabolism: Health and diseases. *Metabolism* 123:. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2021.154869>
244. Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, et al (1992) Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 267:467–472. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48518-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48518-3)
245. Liu Z, Patil I, Sancheti H, et al (2017) Effects of Lipoic Acid on High-Fat Diet-Induced Alteration of Synaptic Plasticity and Brain Glucose Metabolism: A PET/CT and 13C-NMR Study. *Sci Reports* 2017 7:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05217-z>
246. Wanders RJA, Waterham HR (2006) Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. <http://dx.doi.org/101146/annurev.biochem.74082803133329> 75:295–332. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.74.082803.133329>
247. Kuhl WE, Spector AA (1970) Uptake of long-chain fatty acid methyl esters by mammalian cells. *J Lipid Res* 11:458–465. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)42955-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)42955-4)
248. Laposata EA, Harrison EH, Hedberg EB (1990) Synthesis and degradation of fatty acid ethyl esters by cultured hepatoma cells exposed to ethanol. *J Biol Chem* 265:9688–9693. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38725-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38725-3)
249. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G, et al (2014) RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* 63:1978–1993. <https://doi.org/10.2337/db13-1383>
250. Chen Q, Xiong C, Jia K, et al (2019) Hepatic transcriptome analysis from HFD-fed mice defines a long noncoding RNA regulating cellular cholesterol levels. *J Lipid Res* 60:341–352. <https://doi.org/10.1194/jlr.M086215>
251. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL (2019) The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* 50:892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
252. Majumder S, Amatya N, Revu S, et al (2019) IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. *Nat Immunol*. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0367-4>
253. Machacek M, Saunders H, Zhang Z, et al (2019) Elevated O-GlcNAcylation enhances pro-inflammatory Th17 function by altering the intracellular lipid microenvironment. *J Biol Chem* 294:8973–8990. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008373>
254. Fann DYW, Lim YA, Cheng YL, et al (2018) Evidence that NF-κB and MAPK Signaling Promotes NLRP Inflammasome Activation in Neurons Following Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0394-9>
255. Nogueira G, Solon C, Carraro RS, et al (2020) Interleukin-17 acts in the hypothalamus reducing food intake. *Brain Behav Immun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.012>

256. Shrestha A, Bruckmueller H, Kildalsen H, et al (2020) Phosphorylation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) at serine 857 is regulated by the p38MAPK-MK2 axis and affects NF- κ B-mediated transcription. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68219-4>
257. Santa-Cecília F V., Socias B, Ouidja MO, et al (2016) Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- κ B Signaling Pathways. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9592-2>
258. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC (1999) NF- κ B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF- α -, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 162:5337–5344
259. Akieda-Asai S, Ma H, Date Y (2019) Palmitic acid induces guanylin gene expression through the toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway in rat macrophages. *Am J Physiol - Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00081.2019>
260. Dong Z, Zhuang Q, Ning M, et al (2020) Palmitic acid stimulates NLRP3 inflammasome activation through TLR4-NF- κ B signal pathway in hepatic stellate cells. *Ann Transl Med*. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.21>
261. Li DX, Wang CN, Wang Y, et al (2020) NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis and apoptosis in hippocampus neurons mediates depressive-like behavior in diabetic mice. *Behav Brain Res* 391:112684. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112684>
262. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y (2019) The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/IJMS20133328>
263. Liu X, Xia S, Zhang Z, et al (2021) Channelling inflammation: gasdermins in physiology and disease. *Nat Rev Drug Discov* 2021 205 20:384–405. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00154-z>
264. Swanson K V., Deng M, Ting JPY (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19:477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
265. Sadleir KR, Kandalepas PC, Buggia-Prévot V, et al (2016) Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 132:235–256. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1558-9>
266. Kirov SA, Fomitcheva I V., Sword J (2020) Rapid neuronal ultrastructure disruption and recovery during spreading depolarization-induced cytotoxic edema. *Cereb Cortex* 30:5517–5531. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa134>
267. Loehfelm A, Elder MK, Boucsein A, et al (2020) Docosahexaenoic acid prevents palmitate-induced insulin-dependent impairments of neuronal health. *FASEB J* 34:4635–4652. <https://doi.org/10.1096/fj.201902517R>
268. Qian C, Zhang M (2021) RTN3 – ASC interaction: the potential mechanism behind diabetes-induced cortical neuritic dystrophy. *Neurosci Lett* 766:136333. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136333>
269. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, et al (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205670200>
270. Revollo JR, Grimm AA, Imai SI (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200>
271. Kreutzenberg SV De, Ceolotto G, Papparella I, et al (2010) Downregulation of the Longevity-Associated Protein Potential Biochemical Mechanisms. *Diabetes* 59:. <https://doi.org/10.2337/db09-1187.S.V.d.K>
272. Caito S, Rajendrasozhan S, Cook S, et al (2010) SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB J* 24:3145–3159. <https://doi.org/10.1096/FJ.09-151308>
273. Gao Z, Zhang J, Kheterpal I, et al (2011) Sirtuin 1 (SIRT1) Protein Degradation in Response to Persistent c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) Activation Contributes to Hepatic Steatosis in Obesity. *J Biol Chem* 286:22227–22234. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.228874>
274. Milner J (2009) Cellular Regulation of SIRT1. *Curr Pharm Des* 15:39–44. <https://doi.org/10.2174/138161209787185841>
275. Katto J, Engel N, Abbas W, et al (2013) Transcription factor NF κ B regulates the expression of the histone deacetylase SIRT1. *Clin Epigenetics* 5:11. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-5-11>
276. Strum JC, Johnson JH, Ward J, et al (2009) MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol* 23:1876–1884. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0117>
277. Hadar A, Milanese E, Walczak M, et al (2018) SIRT1, miR-132 and miR-212 link human longevity to Alzheimer's Disease. *Sci Rep* 8:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26547-6>
278. Qazi TJ, Lu J, Duru L, et al (2021) Upregulation of mir-132 induces dopaminergic neuronal death via activating SIRT1/P53 pathway. *Neurosci Lett* 740:135465. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135465>

279. Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C, et al (2007) Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor- κ B in neurons and glia upon exposure to β -amyloid peptides. *J Neurosci Res* 85:1194–1204. <https://doi.org/10.1002/JNR.21252>
280. Chami L, Buggia-Prevot V, Duplan E, et al (2012) Nuclear Factor- κ B Regulates b-APP and b- and γ -Secretases Differently at Physiological and Supraphysiological AB Concentrations. *J Biol Chem* 287:24573–24584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333054>
281. Ben Halima S, Mishra S, Raja KMP, et al (2016) Specific Inhibition of β -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Rep* 14:2127–2141. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.01.076>
282. Ye X, Feng T, Tammineni P, et al (2017) Regulation of Synaptic Amyloid- β Generation through BACE1 Retrograde Transport in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 37:2639–2655. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2851-16.2017>
283. Andrew RJ, Fernandez CG, Stanley M, et al (2017) Lack of BACE1 S-palmitoylation reduces amyloid burden and mitigates memory deficits in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 114:E9665–E9674. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1708568114>
284. Lee H, Seo H, Ha I, Chung S (2007) Overexpression of BACE1 stimulates spontaneous basal secretion in PC12 cells. *Neurosci Lett* 421:178–183. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2007.01.082>
285. Kimura R, Devi L, Ohno M (2010) Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurochem* 113:248–261. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.06608.X>
286. Das B, Singh N, Yao A, et al (2021) BACE1 controls synaptic function through modulating release of synaptic vesicles. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/S41380-021-01166-2>
287. Köster A, Chao YB, Mosior M, et al (2005) Transgenic angiopoietin-like (Angptl)4 overexpression and targeted disruption of Angptl4 and Angptl3: Regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0476>
288. Hegardt FG (1998) Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie* 80:803–806. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)88874-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)88874-4)
289. Tencomnao T, Yu RK, Kapitonov D (2001) Characterization of the human UDP-galactose : ceramide galactosyltransferase gene promoter 1. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1517:416–423. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00283-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00283-9)
290. Cook ECL, Nelson JK, Sorrentino V, et al (2017) Identification of the ER-resident E3 ubiquitin ligase RNF145 as a novel LXR-regulated gene. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172721>
291. Koul O, Chou KH, Jungalwala FB (1980) UDP-galactose-ceramide galactosyltransferase in rat brain myelin subfractions during development. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/bj1860959>
292. Schaeren-Wiemers N, Van Der Bijl P, Schwab ME (1995) The UDP-Galactose:Ceramide Galactosyltransferase: Expression Pattern in Oligodendrocytes and Schwann Cells During Myelination and Substrate Preference for Hydroxyceramide. *J Neurochem*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052267.x>
293. Zhang L, Rajbhandari P, Priest C, et al (2017) Inhibition of cholesterol biosynthesis through RNF145-dependent ubiquitination of SCAP. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28766>
294. Menzies SA, Volkmar N, van den Boomen DJH, et al (2018) The sterol-responsive RNF145 E3 ubiquitin ligase mediates the degradation of HMG-CoA reductase together with gp78 and hrd1. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.40009>
295. Chen C-H, Zhou W, Liu S, et al (2012) Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:77–90. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000149>

10. ANEXOS

11.1 Anexo 1: Morfología neuronal en condiciones control y después de 24 horas con AP.

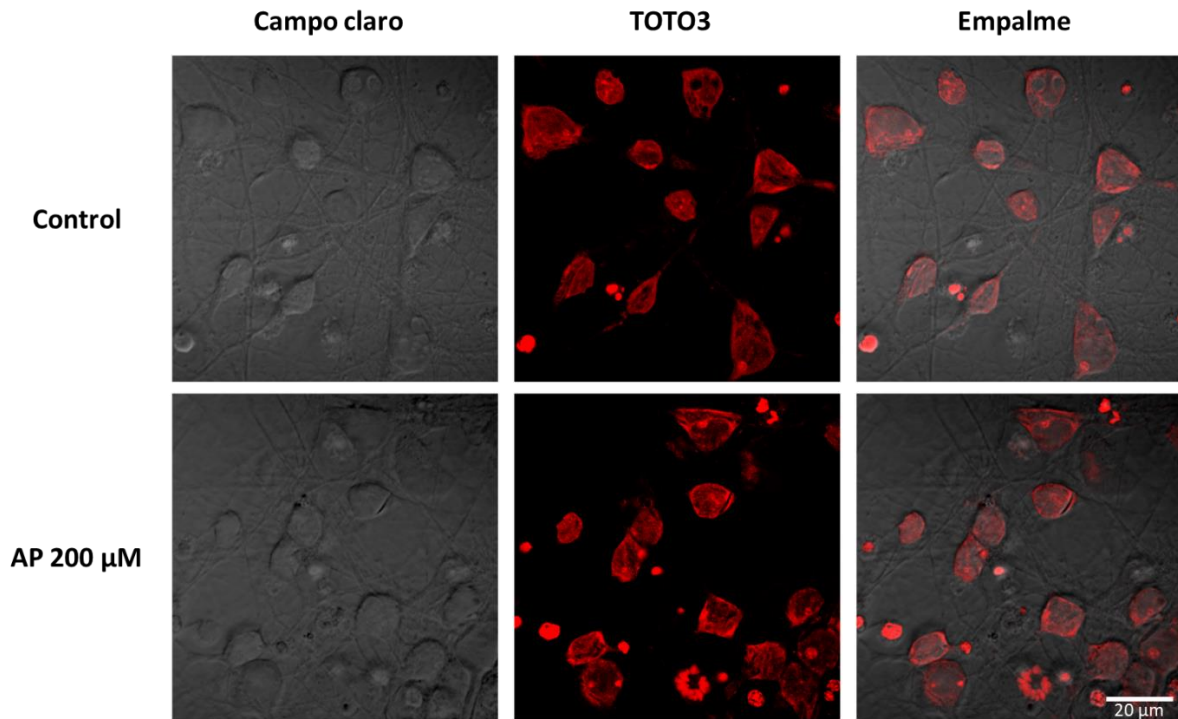


Figura 20 La morfología neuronal tras el tratamiento con AP no se altera. Cultivos neuronales en condiciones control y tratados por 24 horas con 200 μM de AP. No se observan diferencias en la morfología vista en campo claro ni en el núcleo utilizando el marcador TOTO3 (rojo).

11.2 Anexo 2: Análisis de componentes principales (PCA).

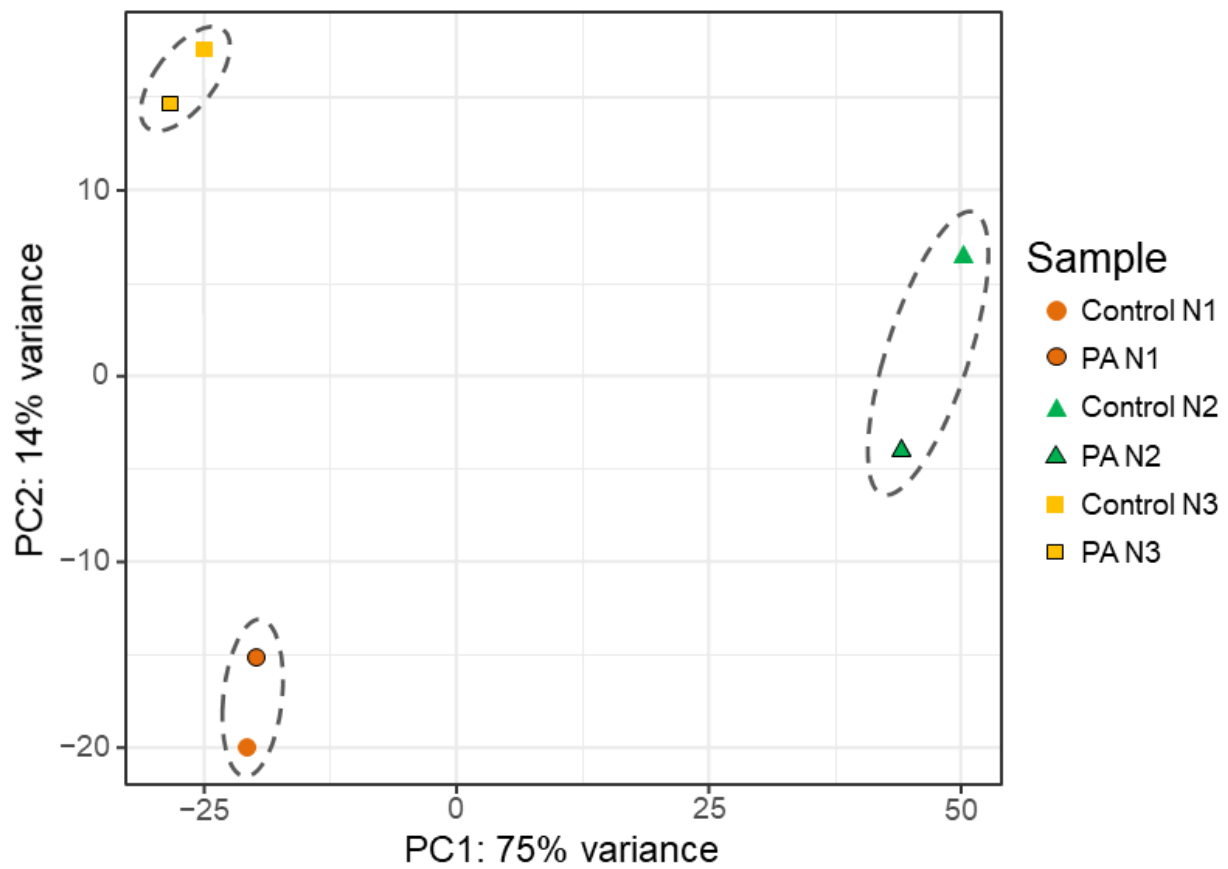


Figura 21 Análisis de componente principal (PCA). Se observa que hay diferencias entre las muestras control (figuras sin borde negro) y las tratadas con AP (figuras con bordes negros). Sin embargo, la mayor diferencia es entre las ratas de las cuales provienen los cultivos de cada condición (N1, N2 y N3). Esta diferencia es la que separa a las muestras en tres grupos (óvalos con líneas discontinuas).

11.3 Anexo 3: Resultados preliminares de las perspectivas: reclutamiento diferencial de factores de transcripción ante la exposición de AP en neuronas.

Dado que los resultados presentados sugieren que el AP puede modular a través de diferentes vías a factores de transcripción involucrados en la regulación de genes importantes en la generación de marcadores de neurodegeneración, se realizaron algunos experimentos para empezar a abordar la posibilidad de un reclutamiento diferencial de factores de transcripción al promotor de *Bace1*. El promotor de *Bace1* tiene sitios consenso para p65 y PPAR γ (Fig. 22), los cuales son importantes en la regulación transcripcional de este gen [16, 295]. De manera importante para este contexto, ambos pueden ser regulados por SIRT1 a través de la desacetilación de lisinas. SIRT1 al desacetilar a p65 inhibe su actividad como factor de transcripción [187], por lo que no se podría unir al promotor de *Bace1* y no induciría un aumento en la expresión de este gen. En cambio, PPAR γ tiene un efecto contrario al ser desacetilado por SIRT1, ya que al no estar acetilado puede ser reclutado al promotor de *Bace1*, pero no induce la expresión del gen [16]. Es decir, funciona como un modulador negativo de la transcripción.

```

>NC_005107.4:50138092-50162388 Rattus norvegicus strain mixed chromosome
8, Rnor_6.0
GTTATTGGGTAACGCATCAATTTTTCCTCCGATACGATGCTATATACACACCCCACTTCCCACTATATGT
CAATCCGTTTCAATGCTGTATTGTTTTCGGGCGCTCAATGTTGGGCGCTTATGTGTCAAGTAGGTGCT
CTGCCATGAAACACCGCCAGGATTTATTTTATGAGACAGACTCTCGCTACATCAGACTAGCCCTTGA
GCTCATTCATAGCCGACGACTGCTGACTCAGACTCCTGCTTAGCCTCCCGTATACCTGGGA
TACAGACTCCCTACCAGCCCTCGCTGATGTAGTACTACTGCGCATGAACTCCTGGTGTCTCTTC
TCTGCGCCTCCCAATGCTGAGATCAATTTTTCACCTTACCGAGTTGGCCAGGCTATGTAGGCTCTGT
GTGGGAGAGGGCGGAAGATGCTGGCATGTTGTTTTCATGCTGTAATCACACTGGCATGTGGAGGCT
GAAGGTTTGGGCGCAGCCGACTCCAGATGAGATCTGAAAAGAGCACGTGAGAATTAATGACCTCCCT
TTCTTGATTAATCTCATTGATAACACTTACTGTTTCTCCTTTTGGGGCGCTGGGTTGCAGTAGA
GCTTACACTGCTGACTTGGGTGCTTACCACTGAGCCACACCCCGCCAGCCACACCCCA
ACCCACGAGCCACCCCTAGCTCTCAGCTACTTATTAGATGTTTCCCTAGTTTACTTTTGGC
TTTTTTTTTTTCTTTCTTTTGGAGCTGAGACCGAAGCCAGGCTTCCACTTCTAGCCGGG
CCTACCACTGAGCTAAATCCCACTTTTTTCTTTAAATCAGAAATGGTGGCTGGATTTTATCC-AGGG
CTTTCCACCTCTGATAAATGATATGTGTCTAATCACAAATTTAAGCTAACAGGACCCCAAGCCCTT
CATCTACGCTCTCTCAAAGAGTAATGTTGGTATGCTCAGAGTCTAACACTGAGAGCTTCCCTCAG
TCTGTCTGGTGGGAAGTAATCAGG-GGGTCAAGAGATGATATCACAAATCAAAGCCACAGCAAAATCA
CACATAGGAGACAGCCACTCCTGGCTGGCAGGCTGAATGCTGTGAGCTGAAAAGGTAGAGGTTTC
CCGTGGATCTGGTGAAGTGGTTGTTGACTGACATCTCTATCCCTTAAATTTGCTCCCTCCAGTCT
CTACTCCRAAAATCTCCAAATTTAGGTTAGATAAATGTCACCTCTTAGGATGGGATATTTTT
GTTCTTTTTTGGACAGAGTTCTATGATGTTGCTGGCTGTCTTGAATCTATGTAGCCAAAC
TACCTCGAATTTATAGAGATCTCCTGCTACTGCTCCTGTTGGGCTGAGATTAAGGCAATGTGCCTTAA
CGTCTGGGATATACCCCAATTTTTAATACCACTGTGGCAAGAGTCACTTCTCCCTGTTAATCTC
TTTAGGATCTGTGCATCTTTTTCGCCCTGTGCAAGGCAAGTGGCTGGCCTCAGAGGTTTGCACGG
GGATGGGATGTTAATCAATGCTAATTCAGGAATCAGGCAAGGAGTTTGCATCAAAGTTGAAGTAC
CTAGACCGCACAGTATGTTTGGAGGCCCTATATCCAAAATAAATAAATAACAAACAAACAAACAAAT
AAATATGAAAGAGACTAGCAGATGAGAGTATGTGATTTGGTCTTCTTGTATCTCCAGACTAT
GAAAGGATGGGATCAAGGCTCCGACAGTGAATCCATCTCCGACAGGCAATCCAGCCCTTTC
AGCCCGAGACTGGCTGCTGCCAAGGAGACTACACTTCCACAGATCCAGGATAGGAAAAC
CCTTTGGCTTTGACAGCCACCGCCACAGCCCTTCCGCTCCCGAGCTGCTAGGTTGCTGGAGCCGGG
AGCTGGATTTAGTGGGCTGAGCAGCCGACGCGCAGGAGCTGGGATCCCTCAGCTGCAAGTCC
GCCTGGAAGACCTGAAAGCTGACGGCTCCGATAGCCATGCCCGCCCTCCAGCCCAAGGGGCGCG
ATCCCCCGCTGAGGCTGGCGTCCGCTCCAGATGATGCTGGTCCCGGATGCCATGCTGCTCTCTC
TCTGTGCGCTACAGATTTCTCTGCCCACTCCACCGCCGGGACAGGACTGAGCGAGGGGCGCTGCA
GACTGCACTCTGATGCCCGGAGGCGCTCCTCTGAGGAAAGCCACCCACCCAGACTTAGGGGCA
GGCAGAGGGACATGCGCAACCGGAGCCCAAGGCCCCG
GCTCACAGTCCCCGGGCTGCCCTGGCTCCTGCTATGGTGGGCTCGGGAATGCTGCTGCCAGGA
ACCACTCGGATCCGACTGCCCTTCGACGGGCTGGCAGGGCCACCCCTGGGCTGAGGCTGCC

```

p65
PPAR γ

Figura 22 Secuencia del promotor de *Bace1*. El color lila indica las secuencias consenso encontradas a las que p65 se puede unir, en verde la secuencia consenso identificada para la unión de PPAR γ y el codón en rojo indica el sitio de inicio de la transcripción seguido por la secuencia codificante en azul.

Por otro lado, el efecto del AP depende de la concentración y tiempo que al que estén expuestas las células [100, 232]. Dado esto se esperaría que, ante una concentración determinada de AP, el mRNA de *Bace1* cambie su expresión dependiente del tiempo. Se propone que esto sea efecto de la modulación de la actividad de p65 y PPAR γ dependiente del tiempo de exposición al AP. En este sentido, se cuantificó mediante qRT-PCR el mRNA de *Bace1* a diferentes tiempos de exposición (Fig. 23a). De manera interesante, a 1 hora de exposición el mRNA disminuye, a las 3 horas aumenta y en tiempos posteriores se mantiene a niveles similares. Esto sugiere que entre 1 y 3 horas de exposición al AP pudiera haber una regulación diferencial dada por factores de transcripción que responden a SFA, como p65 y PPAR γ .

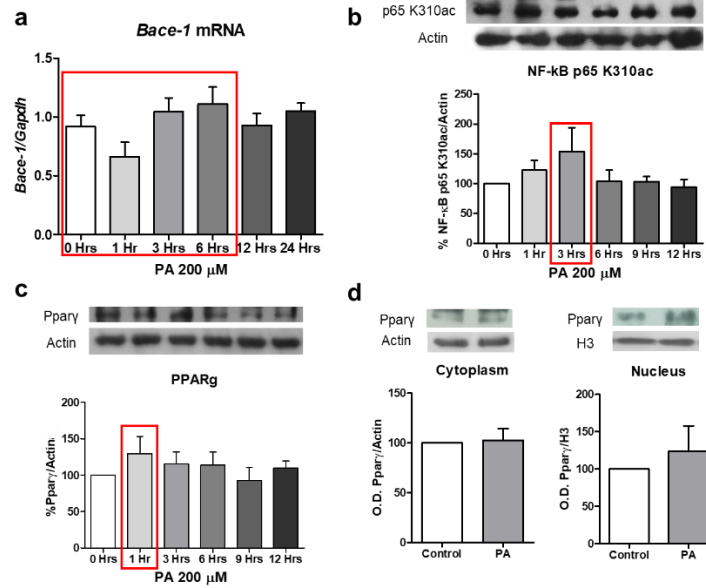


Figura 23 Regulación diferencial del mRNA de *Bace1* a lo largo del tiempo. La curva de tiempo (a) del mRNA de *Bace1* muestra una disminución a 1 hora de exposición al AP y un incremento que se estabiliza a partir de las 3 horas. La cuantificación de p65 activo (K310ac) demuestra un incremento a las 3 horas, mientras que PPAR γ (c) se encuentra elevado a 1 hora y con una abundancia mayor en núcleo (d). Experimentos preliminares donde para la qRT-PCR de *Bace1* N=3, WB de p65 K310ac N=3, WB de PPAR γ N=3 y fraccionamiento nuclear N=2.

Al realizarse una cuantificación de la cantidad de proteína de PPAR γ y la forma activa de p65 (K310ac), se observó que PPAR γ tiene una tendencia a aumentar a 1 hora de exposición (Fig. 23c) de AP mientras que p65 activa se muestra aumentada a las 3 horas (Fig. 23b). Adicional a esto, se hizo un fraccionamiento nuclear para identificar si PPAR γ se encontraba enriquecida en este compartimiento celular siendo un indicativo de su activación como regulador de promotores. De manera interesante, PPAR γ se enriquece en el núcleo cuando las neuronas son expuestas a AP (Fig. 23d). Estos datos preliminares sugieren que el comportamiento del mRNA de *Bace1* puede estar asociado a la regulación diferencial de ambos factores de transcripción cuando las neuronas son tratadas con AP. Sin embargo, se requieren de más experimentos para poder responder la pregunta planteada y conocer si SIRT1 juega un papel importante en la modulación de estos factores de transcripción y qué efectos neuronales se observan en los tiempos de exposición anteriormente mencionados.

Review

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

Karina Sánchez-Alegria[†], Manuel Flores-León[†], Evangelina Avila-Muñoz,
Nelly Rodríguez-Corona and Clorinda Arias*[✉]

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, DF, Mexico; k.aisa.62@hotmail.com (K.S.-A.); manuel.leonci75@gmail.com (M.F.-L.); avmueva@gmail.com (E.A.-M.); rodriguezcorona.nelly@gmail.com (N.R.-C.)

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

[†] These two authors contributed equally to this work

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



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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

2. PI3K Signaling in Neuronal Metabolism

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

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

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

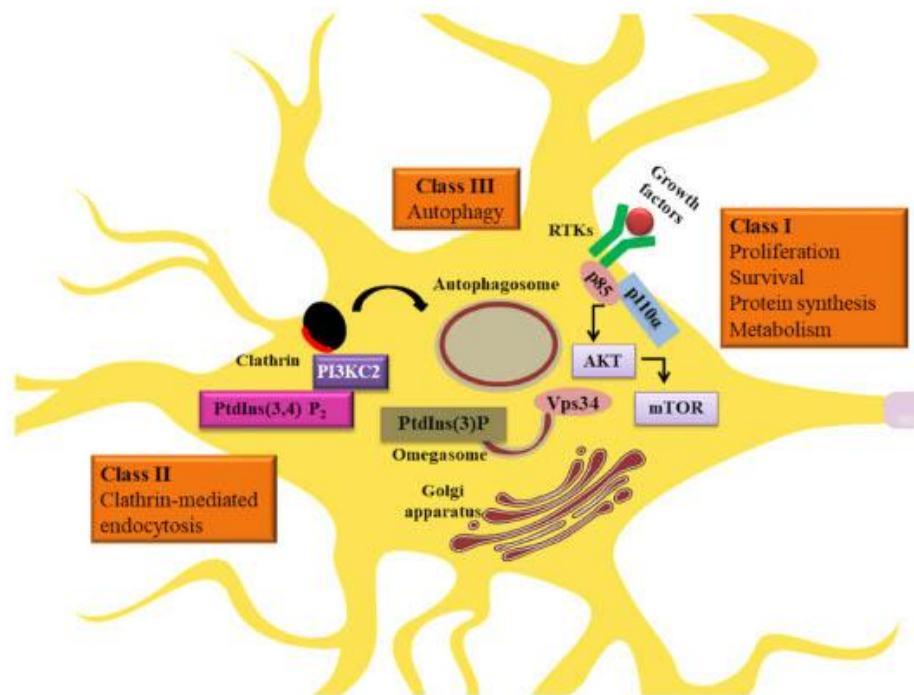


Figure 1. Involvement of different phosphoinositide 3-kinase (PI3K) classes in neuronal function. Class I acting through receptor tyrosine kinase (RTK) pathways mediate survival, proliferation, protein synthesis, and metabolism. Class II participates in vesicular trafficking and class III in autophagy.

3. The Role of PI3K in Neuroinflammation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DNA methyltransferases (DNMTs) are enzymes that are responsible for the addition of a methyl group to the C5 cytosine residue to produce 5-methylcytosine (5mC). During the development of neural stem cells (NSCs), inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway enhances the expression of DNMT1 and DNMT3a and turns off the transcription of genes in a concerted manner through differentiation and maturation processes [94]. PI3K/AKT signaling also induces upregulation of the activity of the TET enzymes producing active DNA demethylation. This activation allows differentiation genes, such as the *Ngn1*, to be activated and promotes neuronal stem cell (NSC) commitment to the neural lineage [94].

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

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

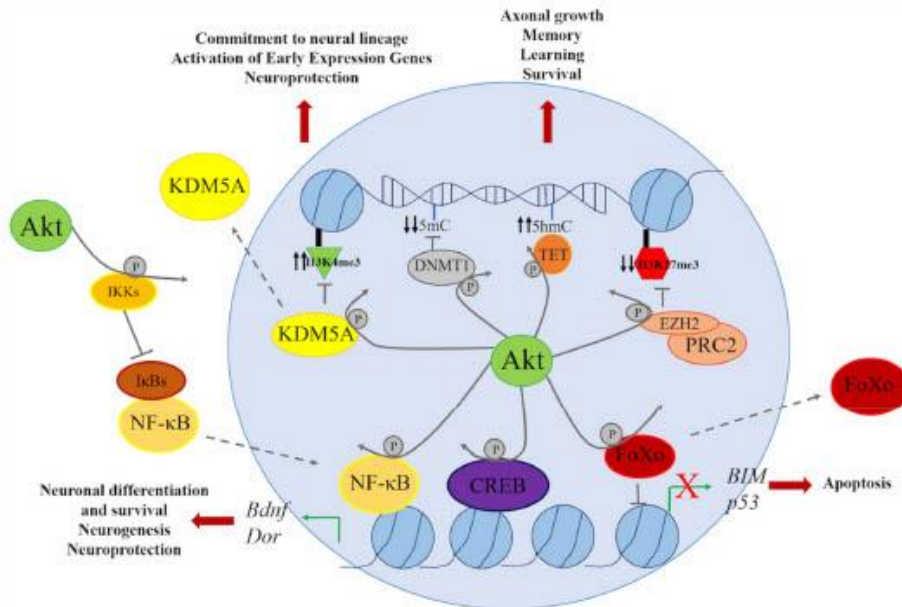


Figure 2. AKT phosphorylates several transcription factors, including NF- κ B, CREB, and FOXO, implicated in the transcription of genes regulating neuronal differentiation, neuroprotection, neurogenesis, and apoptosis, such as *Bdnf*, *Dor*, *BIM*, and *p53*. PI3K stimulation can also inhibit (KDM5A, DNMT1, and EZH2) or activate (TET) chromatin-associated proteins leading to upregulation or repression of genes implicated in neural differentiation, axonal growth, memory, and learning through altering chromatin marks in histone tails of DNA modifications.

5. Vesicle Recycling and Neurotransmission

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

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

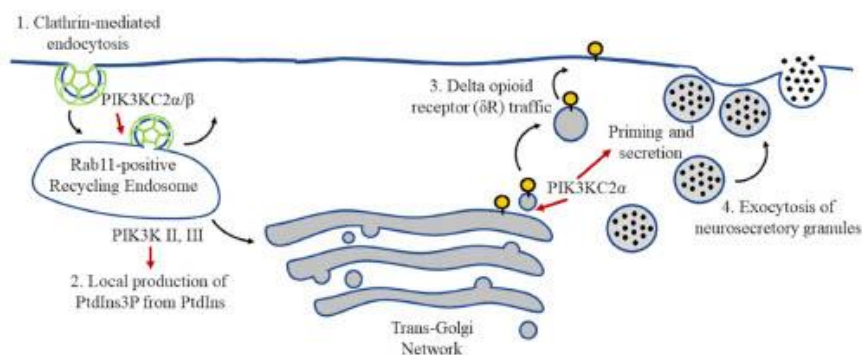


Figure 3. PI3KC2 α and β are associated with clathrin-coated endocytic intermediates (1.) while PI3K II and III participate in the local production of PtdIns3P at recycling endosomes (2.). PI3KC2 α regulates priming and secretion of large dense core vesicles at chromaffin cells (3.) and PI3KC2 α is required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

6. Class III PI3Ks in Neuronal Autophagy

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

7. Conclusions

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

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

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

Funding: This research was funded by CONACyT 282470.

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

References

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

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

33. Höland, K.; Boller, D.; Hagel, C.; Dolski, S.; Treszl, A.; Pardo, O.E.; Ćwiek, P.; Salm, F.; Leni, Z.; Shepherd, P.R.; et al. Targeting Class IA PI3K Isoforms Selectively Impairs Cell Growth, Survival, and Migration in Glioblastoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mirzaa, G.M.; Poduri, A. Megalencephaly and hemimegalencephaly: Breakthroughs in molecular etiology. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **2014**, *166*, 156–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Niswender, K.D.; Morrison, C.D.; Clegg, D.J.; Olson, R.; Baskin, D.G.; Myers, M.G., Jr.; Seeley, R.J.; Schwartz, M.W.; et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: A key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* **2003**, *52*, 227–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Obici, S.; Zhang, B.B.; Karkanias, G.; Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1376–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Oh, H.; Boghossian, S.; York, D.A.; Park-York, M. The effect of high fat diet and saturated fatty acids on insulin signaling in the amygdala and hypothalamus of rats. *Brain Res.* **2013**, *1537*, 191–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pardini, A.W.; Nguyen, H.T.; Figlewicz, D.P.; Baskin, D.G.; Williams, D.L.; Kim, F.; Schwartz, M.W. Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res.* **2006**, *1112*, 169–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sohn, J.-W.; Oh, Y.; Kim, K.W.; Lee, S.; Williams, K.W.; Elmquist, J.K. Leptin and insulin engage specific PI3K subunits in hypothalamic SF1 neurons. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 669–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Agostini, M.; Romeo, F.; Inoue, S.; Niklison-Chirou, M.V.; Elia, A.J.; Dinsdale, D.; Morone, N.; Knight, R.A.; Mak, T.W.; Melino, G. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1502–1514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pearson-Leary, J.; Jahagirdar, V.; Sage, J.; McNay, E.C. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav. Brain Res.* **2018**, *338*, 32–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. McNay, E.C.; Ong, C.T.; McCrimmon, R.J.; Cresswell, J.; Bogan, J.S.; Sherwin, R.S. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2010**, *93*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, T.; Shi, Z.; Wang, Y.; Wang, L.; Zhang, B.; Chen, G.; Wan, Q.; Chen, L. Akt3 deletion in mice impairs spatial cognition and hippocampal CA1 long long-term potentiation through downregulation of mTOR. *Acta Physiol.* **2018**, e13167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kim, J.-I.; Lee, H.-R.; Sim, S.; Baek, J.; Yu, N.-K.; Choi, J.-H.; Ko, H.-G.; Lee, Y.S.; Park, S.W.; Kwak, C.; et al. PI3K γ is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1447–1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Choi, J.-H.; Park, P.; Baek, G.-C.; Sim, S.-E.; Kang, S.J.; Lee, Y.; Ahn, S.H.; Lim, C.S.; Lee, Y.S.; Collingridge, G.L.; et al. Effects of PI3K β overexpression in the hippocampus on synaptic plasticity and spatial learning. *Mol. Brain* **2014**, *7*, 78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lin, C.H.; Yeh, S.H.; Lin, C.H.; Lu, K.T.; Leu, T.H.; Chang, W.C.; Gear, P.W. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* **2001**, *31*, 841–851. [[CrossRef](#)]
47. Seitz, C.; Hugle, M.; Cristofanon, S.; Tchoghandjian, A.; Fulda, S. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and chloroquine synergize to trigger apoptosis via mitochondrial-lysosomal cross-talk. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2682–2693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Liu, Q.; Qiu, J.; Liang, M.; Golinski, J.; van Leyen, K.; Jung, J.E.; You, Z.; Lo, E.H.; Degterev, A.; Whalen, M.J. Akt and mTOR mediate programmed necrosis in neurons. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ribeiro, M.; Rosenstock, T.R.; Oliveira, A.M.; Oliveira, C.R.; Rego, A.C. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *74*, 129–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kim, D.I.; Lee, K.H.; Gabr, A.A.; Choi, G.E.; Kim, J.S.; Ko, S.H.; Han, H.J. A β -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 2820–2834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Lim, S.L.; Rodriguez-Ortiz, C.J.; Kitazawa, M. Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Avila-Muñoz, E.; Arias, C. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *18*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Medeiros, R.; LaFerla, F.M. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp. Neurol.* **2013**, *239*, 133–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Heneka, M.T.; O'Banion, M.K.; Terwel, D.; Kummer, M.P. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2010**, *117*, 919–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Olson, L.; Humpel, C. Growth factors and cytokines/chemokines as surrogate biomarkers in cerebrospinal fluid and blood for diagnosing Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 41–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. McGeer, E.G.; McGeer, P.L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2003**, *27*, 741–749. [[CrossRef](#)]
57. Troutman, T.D.; Bazan, J.E.; Pasare, C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3559–3567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Aksoy, E.; Taboubi, S.; Torres, D.; Delbauve, S.; Hachani, A.; Whitehead, M.A.; Pearce, W.P.; Berenjeno, I.M.; Nock, G.; Filloux, A.; et al. The p110 δ isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1045–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Deng, Q.; Huttenlocher, A. Leukocyte migration from a fish eye's view. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3949–3956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Barberis, L.; Pasquali, C.; Bertschy-Meier, D.; Cuccurullo, A.; Costa, C.; Ambrogio, C.; Vilbois, F.; Chiarle, R.; Wymann, M.; Altruda, E.; et al. Leukocyte transmigration is modulated by chemokine-mediated PI3K γ -dependent phosphorylation of vimentin. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 1136–1146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Stephens, L.; Milne, L.; Hawkins, P. Moving towards a better understanding of chemotaxis. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 485–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ferguson, G.J.; Milne, L.; Kulkarni, S.; Sasaki, T.; Walker, S.; Andrews, S.; Crabbe, T.; Finan, P.; Jones, G.; Jackson, S.; et al. PI(3)K γ has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 86–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Smith, D.; Deem, T.; Bruce, A.; Reutershan, J.; Wu, D. Leukocyte phosphoinositide-3 kinase [gamma] is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *80*, 1491–1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Jones, G.E.; Prigmore, E.; Calvez, R.; Hogan, C.; Dunn, G.A.; Hirsch, E.; Wymann, M.P.; Ridley, A.J. Requirement for PI 3-kinase γ in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp. Cell Res.* **2003**, *290*, 120–131. [[CrossRef](#)]
65. Hirsch, E.; Katanaev, V.L.; Garlanda, C.; Azzolino, O.; Pirota, L.; Silengo, L.; Sozzani, S.; Mantovani, A.; Altruda, E.; Wymann, M.P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **2000**, *287*, 1049–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sasaki, T.; Irie-Sasaki, J.; Jones, R.G.; Oliveira-dos-Santos, A.J.; Stanford, W.L.; Bolon, B.; Wakeham, A.; Itie, A.; Bouchard, D.; Kozieradzki, I.; et al. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **2000**, *287*, 1040–1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Saponaro, C.; Cianciulli, A.; Calvello, R.; Dragone, T.; Iacobazzi, F.; Panaro, M.A. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2012**, *34*, 858–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Chen, G.; Liu, S.; Pan, R.; Li, G.; Tang, H.; Jiang, M.; Xing, Y.; Jin, F.; Lin, L.; Dong, J. Curcumin Attenuates gp120-Induced Microglial Inflammation by Inhibiting Autophagy via the PI3K Pathway. *Cell Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 1465–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Cianciulli, A.; Calvello, R.; Porro, C.; Trotta, T.; Salvatore, R.; Panaro, M.A. PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *36*, 282–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Jung, J.-S.; Choi, M.-J.; Lee, Y.Y.; Moon, B.-I.; Park, J.-S.; Kim, H.-S. Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation by Morin via MAPK, PI3K/Akt, and PKA/HO-1 Signaling Pathway Modulation. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

90. Lu, X.; Deng, Y.; Yu, D.; Cao, H.; Wang, L.; Liu, L.; Yu, C.; Zhang, Y.; Guo, X.; Yu, G. Histone acetyltransferase p300 mediates histone acetylation of PS1 and BACE1 in a cellular model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Spangle, J.M.; Roberts, T.M.; Zhao, J.J. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2017**, *1868*, 123–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jarome, T.J.; Perez, G.A.; Hauser, R.M.; Hatch, K.M.; Lubin, F.D. EZH2 Methyltransferase Activity Controls Pten Expression and mTOR Signaling During Fear Memory Reconsolidation. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 7635–7648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Mastroeni, D.; Delvaux, E.; Nolz, J.; Tan, Y.; Grover, A.; Oddo, S.; Coleman, P.D. Aberrant intracellular localization of H3k4me3 demonstrates an early epigenetic phenomenon in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36*, 3121–3129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Zhang, X.; He, X.; Li, Q.; Kong, X.; Ou, Z.; Zhang, L.; Gong, Z.; Long, D.; Li, J.; Zhang, M.; et al. PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1256–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Grifán-Ferré, C.; Sarroca, S.; Ivanova, A.; Puigoriol-Illamola, D.; Aguado, E.; Camins, A.; Coral, S.; Pallas, M. Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 664–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Choullaras, L.; Mastroeni, D.; Delvaux, E.; Grover, A.; Kenis, G.; Hof, P.R.; Steinbusch, H.W.M.; Coleman, P.D.; Rutten, B.P.F.; Van den Hove, D.L.A. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 2091–2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Watson, C.T.; Roussos, P.; Gang, P.; Ho, D.J.; Azam, N.; Katsel, P.L.; Haroutunian, V.; Sharp, A.J. Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer's disease. *Genome Med.* **2016**, *8*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Nagata, T.; Kobayashi, N.; Ishii, J.; Shinagawa, S.; Nakayama, R.; Shibata, N.; Kueban, B.; Ohnuma, T.; Kondo, K.; Arai, H.; et al. Association between DNA methylation of the BDNF promoter region and clinical presentation in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra* **2015**, *5*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Posor, Y.; Eichhorn-Gruenig, M.; Puchkov, D.; Schöneberg, J.; Ullrich, A.; Lampe, A.; Müller, R.; Zarbakhs, S.; Gulluni, F.; Hirsch, E.; et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **2013**, *499*, 233–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Arcaro, A.; Zvebil, M.J.; Wallasch, C.; Ullrich, A.; Waterfield, M.D.; Domin, J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 3817–3830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Wu, K.; Yang, L.; Chen, J.; Zhao, H.; Wang, J.; Xu, S.; Huang, Z. miR-362-5p inhibits proliferation and migration of neuroblastoma cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase-C2 β . *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1911–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Garcia, M.D.; Formoso, K.; Aparicio, G.I.; Frasch, A.C.C.; Scorticati, C. The Membrane Glycoprotein M6a Endocytic/Recycling Pathway Involves Clathrin-Mediated Endocytosis and Affects Neuronal Synapses. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Vagnozzi, A.N.; Praticò, D. Endosomal sorting and trafficking, the retromer complex and neurodegeneration. *Mol. Psychiatry* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Wu, J.; Petralia, R.S.; Kurushima, H.; Patel, H.; Jung, M.; Volk, L.; Chowdhury, S.; Shepherd, J.D.; Dehoff, M.; Li, Y.; et al. Arc/Arg3.1 Regulates an Endosomal Pathway Essential for Activity-Dependent β -Amyloid Generation. *Cell* **2011**, *147*, 615–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Domin, J.; Gaidarov, I.; Smith, M.E.; Keen, J.H.; Waterfield, M.D. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2 α is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11943–11950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Gaidarov, I.; Smith, M.E.; Domin, J.; Keen, J.H. The class II phosphoinositide 3-kinase C2 α is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 443–449. [[CrossRef](#)]
107. Meunier, F.A.; Osborne, S.L.; Hammond, G.R.V.; Cooke, F.T.; Parker, P.J.; Domin, J.; Schiavo, G. Phosphatidylinositol 3-Kinase C2 α Is Essential for ATP-dependent Priming of Neurosecretory Granule Exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 4841–4851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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



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

11.5 Anexo 5: Palmitic Acid-Induced NAD⁺ Depletion is Associated with Reduced Function of SIRT1 and Increased Expression of BACE1 in Hippocampal Neurons.

Neurochemical Research
https://doi.org/10.1007/s11064-019-02810-8

ORIGINAL PAPER



Palmitic Acid-Induced NAD⁺ Depletion is Associated with the Reduced Function of SIRT1 and Increased Expression of BACE1 in Hippocampal Neurons

Manuel Flores-León¹ · Martha Pérez-Domínguez¹ · Rodrigo González-Barrios² · Clorinda Arias¹

Received: 4 March 2019 / Revised: 29 April 2019 / Accepted: 2 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Increased levels of circulating fatty acids, such as palmitic acid (PA), are associated with the development of obesity, insulin resistance, type-2 diabetes and metabolic syndrome. Furthermore, these diseases are linked to an increased risk of cancer, cardiovascular diseases, mild cognitive impairment and even Alzheimer's disease (AD). However, the precise actions of elevated PA levels on neurons and their association with neuronal metabolic disruption that leads to the expression of pathological markers of AD, such as the overproduction and accumulation of the amyloid- β peptide, represent an area of intense investigation. A possible molecular mechanism involved in the effects of PA may be through dysfunction of the NAD⁺ sensor enzyme, SIRT1. Therefore, the aim of the present study was to analyze the relationship between the effects of PA metabolism on the function of SIRT1 and the upregulation of BACE1 in cultured hippocampal neurons. PA reduced the total amount of NAD⁺ in neurons that caused an increase in p65 K310 acetylation due to inhibition of SIRT1 activity and low protein content. Furthermore, BACE1 protein and its activity were increased, and BACE1 was relocated in neurites after PA exposure.

Keywords Palmitic acid · SIRT1 · BACE1 expression · Neuronal NAD⁺ · Hippocampal neurons

Introduction

Currently, there is an increasing incidence of metabolic alterations related to the intake of unhealthy diets high in saturated fatty acids, cholesterol and sugar. In particular, the increased levels of circulating fatty acids, such as palmitic acid (PA), are associated with the development of insulin resistance in peripheral tissues [1]. Obesity, insulin resistance, type-2 diabetes and metabolic syndrome are also linked to an increased risk of cancer and cardiovascular diseases. Furthermore, these metabolic alterations are related to the appearance of mild cognitive impairment and even

Alzheimer's disease (AD), as suggested by numerous epidemiological studies [2–8]. However, the precise actions of elevated PA levels on neurons and their association with neuronal metabolic disruption that leads to the expression of pathological markers of AD, such as the overproduction and accumulation of the amyloid- β peptide (A β), remain a matter of intense investigation.

Recent data indicate that neurons exposed to PA are prone to develop insulin resistance [9, 10], endoplasmic reticulum stress [11–14], and apoptosis [15]. Furthermore, it is hypothesized that one of the metabolic pathways that may be altered by PA is energy metabolism via modulation of the NAD⁺/NADH ratio, as found in human neuroblastoma cells [10]. In addition to its role in oxidative phosphorylation, NAD⁺ can serve as a coenzyme for the following families of enzymes: poly (ADP-ribose) polymerase (PARPs), histone deacetylases class III (Sirtuins) and transmembrane glycoprotein CD38 [16]. Consequently, an imbalance in the NAD⁺/NADH ratio can be sensed and likely modulates the activity of these enzymes.

Of the seven Sirtuins found in mammals, Sirtuin 1 (SIRT1) is one of the most studied in metabolic conditions, given its sensitivity to the intracellular concentration of

✉ Clorinda Arias
carias@unam.mx

¹ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, DF, Mexico

² Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan)-Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 14080 México, DF, Mexico

NAD⁺ [17]. SIRT1 is responsible for the deacetylation of several transcription factors and residues in histone tails, leading to either the activation or repression of genes [18, 19]. SIRT1 activity is tightly regulated by the concentration of its coenzyme NAD⁺, which can decrease when cells are under high energy intake [20]. The reduction in SIRT1 activity may be detrimental for cell function because a protective role for SIRT1 in a wide variety of age-related diseases in animal models, including AD [21–24], was demonstrated.

One of the histopathological characteristics of AD is the overproduction and accumulation of A β into extracellular amyloid plaques. Most of the amyloid precursor protein (APP) is constitutively cleaved consecutively within the A β sequence by α -secretase enzymes and the γ -secretase complex, preventing A β production. There is another physiologically less active pathway that is favored in AD: the amyloidogenic pathway. In this pathway, APP is proteolyzed by β -secretase (BACE1) outside of the A β sequence and is then further cleaved by the γ -secretase complex, leading to A β formation [25, 26]. It was found that a corresponding downregulation of the NAD⁺-dependent SIRT1 pathway may contribute to the amyloidogenic processing of APP [27, 28]. Nevertheless, the mechanism that connects the intake of high-fat diets, the alteration of cellular metabolism and gene expression leading to aberrant processing of APP, remains to be elucidated.

Therefore, the aim of the present study was to analyze the relationship between the effects of PA metabolism on SIRT1 function and the upregulation of BACE1, which may be associated with the aberrant processing of APP in cultured hippocampal neurons.

Materials and Methods

Chemical and Reagents

PA, methyl-palmitate (methyl-PA) and the specific SIRT1 inhibitor, EX527, were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich). PA and methyl-PA were prepared as stock solutions in ethanol, and the working solutions were prepared the same day of use in 10% bovine serum albumin (BSA)/phosphate buffered saline (PBS) and were incubated at 37 °C for at least 2 h. The inhibitor EX527 was prepared as a stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) and allowed to equilibrate to room temperature for at least 1 h before use.

Cell Culture

Primary hippocampal neuronal cultures were established from Wistar rat brains obtained from 17-day-old embryos as previously reported [29]. Animals were handled with all precautions necessary to diminish their

suffering consistent with the Regulations for Research in Health Matters (México) and with the approval of the local Animal Care Committee. Briefly, hippocampi were dissected, minced with a scalpel in Krebs solution (121 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 25.4 mM NaHCO₃, 14.2 mM Glucose, 0.004 mM Phenol Red) and incubated with 0.25% trypsin at 37 °C for 10 min. The hippocampi were mechanically dissociated using a cell strainer (Corning ®), and the pellet was resuspended in neurobasal medium (Gibco 21103049) supplemented with 2% B27 (Gibco 17504044), 0.5 mM L-Glutamine (Gibco 25030-081) and 20 μ g/mL penicillin/streptomycin (Gibco 15140-122) and plated at 2.1×10^5 cells/cm² in 60 mm plates that were previously coated for 24 h with 10 μ g/mL poly-L-lysine. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added to cultures 3 days after plating to inhibit the growth of non-neuronal cells. We have determined that astrocyte population in these cultures is near 5% as measured by immunocytochemistry against the glial fibrillary acidic protein to stain astrocytes.

Hippocampal neuronal cultures were used for experiments after 12 days in vitro (DIV) and were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere.

Cell Viability

Cell viability was assessed through the conversion of 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) to formazan crystals by mitochondrial respiratory chain reactions [30]. The reduction of MTT is an indicator of mitochondrial redox capacity that is used as a measure of cell viability. In brief, MTT in PBS (5 mg/mL) was added to hippocampal neurons for 1 h at 37 °C in a 1:10 (v/v) ratio after incubation with different concentrations of PA or 200 μ M methyl-PA for 24 h. At the end of the incubation period, the medium was removed, and formazan crystals were solubilized with a solution of acidified isopropyl alcohol (0.04 N HCl). The absorbance of each sample was quantified using a spectrophotometer at 570 nm (Pharmacia Biotech).

Glucose Quantification

Glucose concentration throughout the DIV of the cell culture before and after PA or methyl-PA exposure was assessed with the Accu-Chek System from Roche. Neurobasal cell culture medium without Phenol Red was used to avoid interference with the measurements. One μ L of cell culture medium was placed on the Accu-Chek Test Strips for quantification.

NAD⁺/NADH Quantification

The NAD⁺/NADH content and ratio were determined using a colorimetric NAD⁺/NADH Assay kit from Abcam (ab65348). In brief, after 24 h of exposure to PA or methyl-PA, cell cultures were washed with ice-cold PBS, and the supernatant was discarded. NAD⁺/NADH was extracted using the NAD⁺/NADH extraction buffer provided by the manufacturer with two freeze/thaw cycles on dry ice. Samples were collected and centrifuged. The supernatant was collected and divided in two tubes per sample. One tube per sample was heated for 30 min at 60 °C, the other was stored in ice. The sample was assessed in 96-well microplates with their respective standard curves, the reaction mix and developer (as instructed by the manufacturer). The absorbance of each sample was quantified every 10 min during a 3 h period using a spectrophotometer at 450 nm.

Western Blotting

Hippocampal neurons were lysed and scraped with 200 μ L plate RIPA lysis buffer (50 mM TRIS, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40; complete inhibitor cocktail from Roche Diagnostics) on ice. The protein concentration was determined using the Bio-Rad DCTM protein assay kit. Equal amounts of protein were loaded in 10 or 12% acrylamide-SDS gels, and proteins were then transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad #162-0264). Then, membranes were blocked with 5% nonfat-milk-TBS-T, pH=7.6, at 4 °C with gentle shaking overnight. After blocking, membranes were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: SIRT1 (1:500, Cell Signaling #8469), Acetyl-NF- κ B p65 (Lys310) (1:1000, Cell Signaling #3045), NF- κ B p65 (1:1000, Santa Cruz #sc-8008), BACE1 (1:1000, Cell Signaling #5606) and β -actin (1:2000, Sigma A5316). After three washes with TBS-T, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse antibody (1:10,000, Santa Cruz #sc-2005) or goat anti-rabbit antibody (1:10,000, Santa Cruz #sc-2030) for 2 h at room temperature. Membranes were revealed using a chemiluminescence ECL substrate (Millipore) on Kodak X-Omat film. Densitometric analysis of the obtained bands was performed using ImageJ software. To normalize the data, we divided the values obtained for each band into their respective actin loading control and obtained a ratio. This value was then expressed as a percent of the control values for each experiment.

RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzolTM reagent (Life Technologies), and cDNA was synthesized from 1000 ng of RNA using the ImProm-ITM Reverse Transcription System

(Promega #A3800) with oligo(dT) primers. The quantification of total RNA and cDNA synthesized was achieved using a NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Quantitative PCR (qRT-PCR) was performed using the Kapa SYBRTM Fast ABI PrismTM qPCR Kit (Kapa Biosystems KK4604) with a StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems). All reactions were performed in triplicate, and the expression was normalized using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) mRNA. The sequences of the primers used are as follows: *Sirt1* F, 5'-AGAGCCATGAAGTATGACAAAGAT-3' and *Sirt1* R, 5'-TGGGGTATAGAAGCTTGGAAATTAGTG-3'; *Bace1* F 5'-AAATGGACTGCAAGAGTACAACATA-3'; *Bace1* R 5'-CTTTCTTGGGCAAACGAAGGT-3'; *Gapdh* F, 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCA A-3'; *Gapdh* R, 5'-CTTTAGTGGGCCCTCGGC-3'.

TIRF-Based BACE1 Activity Assay

BACE1 activity was determined using a fluorometric β -secretase activity assay kit from Abcam (ab65357). In brief, after 24 h of exposure to PA, the culture media was removed, and cells were washed with ice-cold PBS. The extraction buffer (provided by the manufacturer) was added to the cells (5×10^6 cells per sample) and homogenized quickly by pipetting up and down a few times. Cells were incubated in extraction buffer on ice for 30 min and centrifuged for 5 min at 4 °C. The supernatant was collected and transferred to a clean tube. The sample was assessed in 96 well microplates (black with clear bottom) with their respective background control well, reaction buffer and β -secretase substrate (as instructed by the manufacturer). The fluorescence of each sample was quantified every 15 min during a 1 h period using a fluorescence microplate reader at Ex/Em = 335/495 nm.

Immunofluorescence

Hippocampal neurons were plated on glass coverslips treated with poly-L-lysine in 12-well plates. After different treatments, the cell culture media was collected and cells were washed once with ice-cold PBS. Then, the cells were fixed with paraformaldehyde 1%/PBS for 10 min and washed twice with PBS. Cells were incubated in blocking solution (normal horse serum 1% PBS) with gentle rocking for 1 h at room temperature. Next, cells were incubated with anti-BACE1 antibody (1:1000, Cell Signaling #5606) overnight and then incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit Alexa 488, 1:1000) for 2 h at room temperature. Immediately after incubation with the secondary antibody, nuclei were stained with Hoechst (1:1000) in PBS for 20 min. Cells were washed three times with PBS and covered with fluorescent mounting medium (DAKO). Negative

controls were performed excluding the primary antibodies from the procedure.

Microscopy and Quantification

Observations were performed on a Nikon A1R + confocal microscope (Nikon Instruments Inc) with a Plan Apo 40 \times oil (N.A. 0.95) objective and XYZ digital images were obtained with NIS-Elements C imaging software (Nikon). One mature neuron with a long axon and well-developed dendritic arbor was selected per field. Twenty images from each independent culture dish were used per experimental condition ($n=3$) for a total of 60 neurons per condition. Z projections were performed on each image, and 1 pixel-wide line segments were traced along 50 micrometers of a random neurite with the same length from each experimental condition. The fluorescence intensity of each neurite was measured with ImageJ software. For each analysis we traced 50 μM -long primary neurite and measured the sum of pixel intensity from the selected region divided by the total number of pixels normalized accordingly to the area of interest regardless of neuron size.

Statistical Analysis of Data

GraphPad Prism 5™ was used for statistical analysis of data. All data are expressed as the mean \pm S.E.M. We used the Mann–Whitney test for all experiments except for the glucose consumption assay (Wilcoxon matched pairs test)

and NAD^+/NADH ratio quantification (one-way ANOVA—Kruskal–Wallis Test). $P < 0.05$ was considered significant.

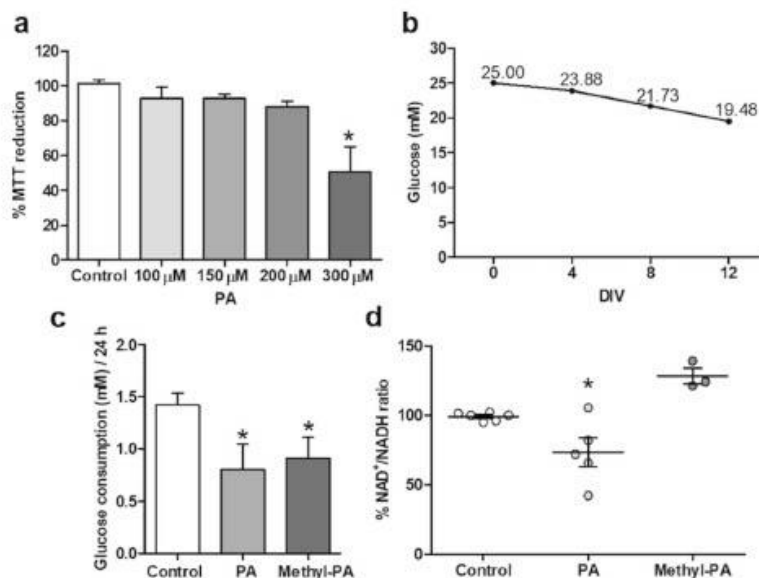
Results

Metabolic Changes After PA Exposure

We first analyzed the effects of PA exposure for 24 h on neuronal viability at different concentrations. Using the MTT viability assay, we did not observe PA toxicity at 150 or 200 μM . However, after 300 μM PA exposure, a significant 40% reduction of neuronal viability was produced (Fig. 1a). Similar to our previous report in human neuroblastoma cells [10], concentrations ranging from 150 to 200 μM were selected because they are not neurotoxic and represent concentrations close to those found in the plasma from obese and diabetic patients [31].

Since neurons consume glucose as their primary energy source and because there is no clear evidence about the use of fatty acids as energy substrates [32, 33], we maintained the culture medium during the time of the experiment to allow glucose consumption and to generate metabolic stress by reducing glucose availability (Fig. 1b). Then we measured the amount of glucose that was consumed by neurons of 12 DIV in a period of 24 h with and without exposure to PA. Interestingly, after exposing neurons to PA or methyl-PA, glucose consumption was significantly reduced compared to the control group (Fig. 1c), suggesting that neurons can

Fig. 1 Effects of PA in glucose utilization and NAD^+ levels. Neuronal viability was assessed by MTT after 24 h exposure to different concentrations of PA (a). Glucose consumption decreases with DIV (b), and by 12 DIV, PA and methyl-PA reduces the neuronal glucose uptake (c). The NAD^+/NADH ratio was measured after 24 h of exposure to 200 μM of PA or methyl-PA (d). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 3 to 5 independent cell cultures in duplicate. * $P < 0.05$ versus control group



utilize other energy substrates when the glucose concentration is decreased, and free fatty acid levels are increased.

To further analyze the metabolic adaptations of neuronal exposure to PA, we measured the NAD^+/NADH ratio to reflect the redox state of neurons. Consistent with the observation of reduced glucose utilization in the presence of PA, a significant reduction in NAD^+ contents by nearly 75% was also observed (Fig. 1d), indicating that the metabolism of PA but not methyl-PA by neurons is associated with a decreased NAD^+ pool and increased NADH content.

PA Exposure is Associated with Reduced SIRT1 Content and Activity

Given that SIRT1 activity is very sensitive to intracellular NAD^+ availability, we next examined the consequences of PA exposure and metabolism on the activity of SIRT1, as well as its expression and protein content. As expected, we found that 24 h of exposure to 200 μM of PA significantly decreased SIRT1 activity. The effect of PA on SIRT1 enzymatic activity was determined through the detection of the acetylation status of the p65 subunit of the transcription factor NF- κB , a well-established substrate of SIRT1 [34]. Western blot results showed that PA exposure produced a significant increase in acetylation of p65 at lysine 310 (K310ac) (Fig. 2a). Similar results were observed when neurons were exposed to the specific SIRT1 inhibitor EX527 (Fig. 2b). Moreover, the protein levels of SIRT1 (Fig. 3a) were reduced by 38% and were accompanied by a slightly increase in *Sirt1* mRNA (Fig. 3b).

PA Exposure is Associated with Increased BACE1 Expression and Activity

It was previously reported that SIRT1 activation can reduce BACE1 expression [27, 35]; therefore, we investigated the possible link between PA effects and the levels and function of this amyloidogenic-related enzyme. We compared the effects produced by PA exposure with that produced by the pharmacological inhibition of SIRT1 with EX527. As shown in Fig. 4, both compounds increased BACE1 protein (Fig. 4b, d). Additionally, PA produced a significant 10% increase in neuronal BACE1 activity (Fig. 4c) and slightly upregulated its mRNA (Fig. 4a). Taken together, these results suggest that PA metabolism results in SIRT1 inhibition and BACE1 activation.

Considering BACE1 activity occurs preferentially in synaptic terminals, [36–38] we assessed the localization of BACE1 after PA exposure. As shown in Fig. 5, the treatment of hippocampal neurons with PA led to the localization of this enzyme in neurites, not in the soma.

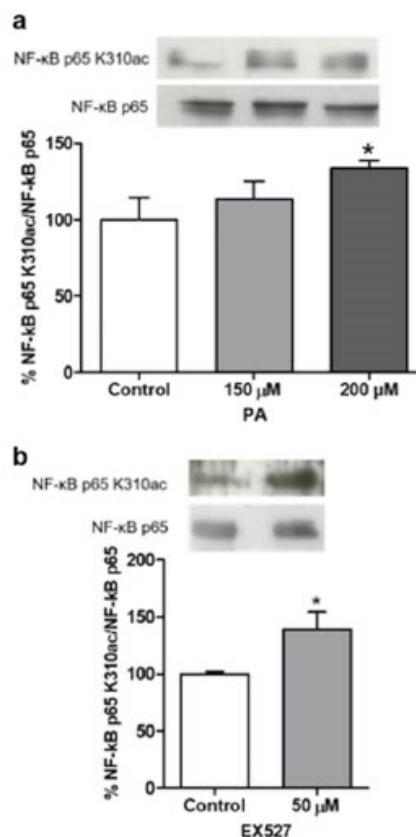


Fig. 2 PA exposure and SIRT1 inhibition increase the acetylation of NF- κB . Neurons exposed for 24 h to PA show increased K310ac of the p65 subunit (**a**) in a similar manner that occurs when SIRT1 is inhibited by 3 h of EX527 incubation (**b**). Representative Western blots and densitometric analysis. Data are the mean \pm S.E.M. from 3 independent experiments. * $P < 0.05$ versus control group

Discussion

In the present work, we provided evidence that neuronal exposure to PA is associated with NAD^+ reduction, decreased function of SIRT1 and upregulation of the limiting enzyme for $\text{A}\beta$ production, BACE1, in cultured hippocampal neurons.

Exposure to PA produces a number of metabolic consequences in neurons, such as increased energy metabolism and insulin resistance [9, 10], oxidative stress [39] and ceramide production [40]. Our data showed that in cultured hippocampal neurons exposed to PA decreased their glucose consumption and reduced their NAD^+/NADH ratio, suggesting that hippocampal neurons can metabolize PA

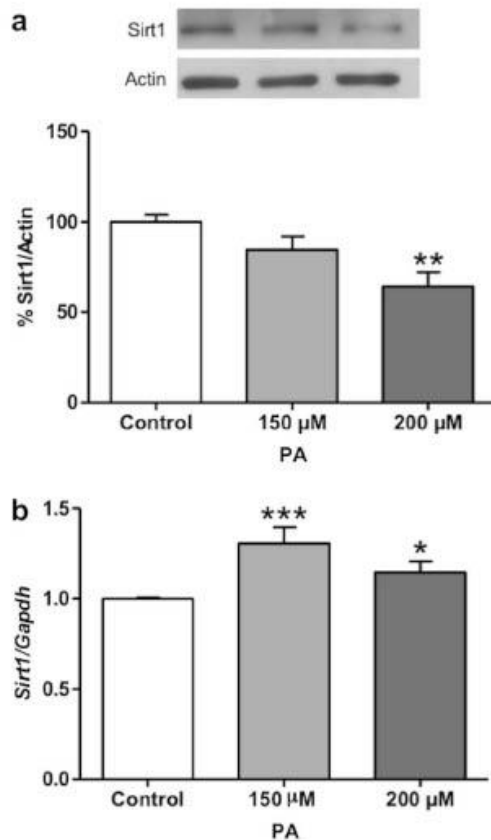


Fig. 3 PA exposure reduced SIRT1 protein and increased *Sirt1* mRNA. SIRT1 protein levels decreased after 24 h of exposure to 150 or 200 μ M PA (a), whereas *Sirt1* mRNA was increased under the same conditions (b). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 5 independent experiments. Representative Western blot and densitometric analysis. *** $P < 0.001$ versus control group, ** $P < 0.01$ versus control group; * $P < 0.05$ versus control group

through a metabolic energy pathway, as previously shown in human neuroblastoma cells [10]. Although under physiological conditions neurons are not probably exposed to the PA concentrations used in the present study, evidence exists for free fatty acid transport to the brain [41] that may be augmented in certain conditions that increase the plasma levels of saturated fatty acids. In fact, a significant increase in the PA levels have been reported in the parietal cortex from Alzheimer's disease patients [42].

In peripheral cells, most PA is β -oxidized by mitochondria, which is a catabolic process that generates NADH through the reduction of NAD⁺. Although it was proposed that PA is not a significant source of energy for neurons

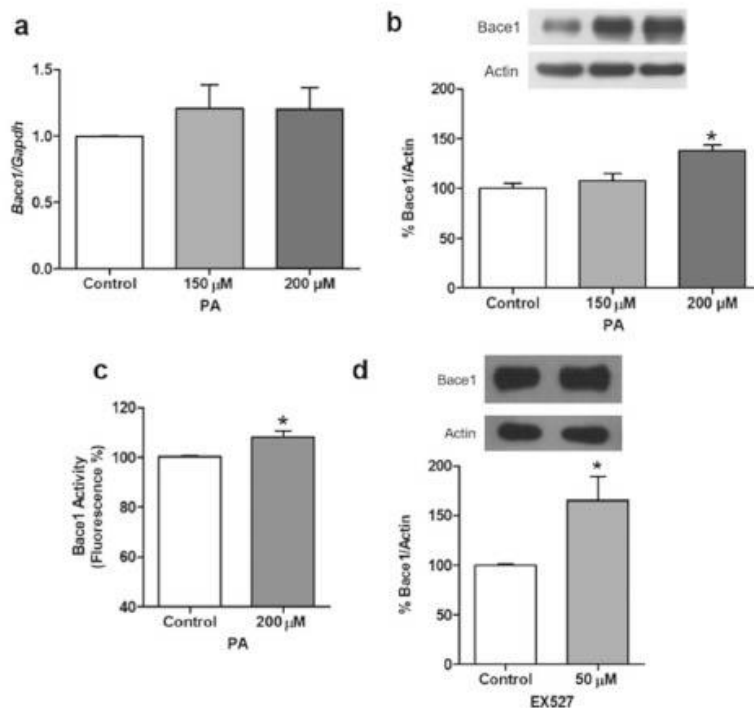
[32], it was also reported that neuronal mitochondria is capable, albeit not efficiently, of oxidizing fatty acids [33]. NAD⁺ plays a central role in cells as a coenzyme for NAD⁺-dependent enzymes and is an indicator of the redox state of cells. The reduction in the neuronal NAD⁺/NADH ratio may occur via different routes and indicates an adaptive response to metabolizing a large influx of PA into mitochondria or even peroxisomes [43]. In this sense, neurons possess peroxisomes that can β -oxidize long-chain and very long-chain saturated fatty acids [44]. Therefore, considering that mitochondrial β -oxidation may be limited in neurons, a relatively larger peroxisomal β -oxidation capacity may become active after an exposure to high levels of saturated fatty acids. The contribution of peroxisomes to the metabolism of saturated fatty acids in neuronal tissue is an interesting avenue to be explored. The specific effects of PA in the activation of neuronal metabolism were supported by the finding that the PA analog, methyl-PA, also reduced glucose consumption but was unable to deplete NAD⁺ at the analyzed times. Notably, in hepatocytes high concentrations of palmitate are oxidized more rapidly than similar concentration of methyl-PA [45], consistent with present findings.

Although the most likely mechanism by which PA reduces NAD⁺ levels is through energy metabolism, the role of ceramide in PA-induced NAD⁺ depletion in neurons could also be considered. PA exposure produces intracellular ceramide accumulation in both astrocytes and neurons [40, 46], and recently, it was reported that the ceramide-induced stress response resulted in NAD⁺ depletion and Sirtuin inhibition in *Drosophila melanogaster* [47].

Several studies demonstrated that changes in the availability of intracellular NAD⁺ are sufficient to decrease SIRT1 activity [48–50], resulting in a reduction of the deacetylation rate of acetyl-lysine residues. We found that the PA-dependent reduction of NAD⁺ was associated with a reduction in SIRT1 function, assessed as the increase in the acetylation state of the NF- κ B p65 [51], which was similar to that produced by the specific SIRT1 inhibitor EX527. However, we also found that PA reduced the protein content of SIRT1 and significantly increased the expression of its mRNA. Neuronal exposure to PA is accompanied by an induction of oxidative stress and JNK activation [9, 52]. All these conditions favor SIRT1 proteosomal degradation [53, 54] and may increase SIRT1 expression [55] to compensate for the loss of protein.

There is evidence that SIRT1 modulates the promoters of genes that encode the enzymes of the amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, through the activation or inactivation of transcription factors [35, 56]. More recently, Marwarha et al. [14] reported that the PA-induced increase in BACE1 expression is mediated by the NF- κ B pathway, dependent on the endoplasmic stress-associated transcription factor (CHOP) in neuroblastoma cells and in an in vivo

Fig. 4 Changes in BACE1 in response to PA exposure. After 24 h of PA treatment, *Bace1* mRNA was slightly increased (a), as well as its protein contents (b) and enzymatic activity (c). The increase in BACE1 protein content was also observed after SIRT1 inhibition with EX527. d Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 3–6 independent experiments. * $P < 0.05$ versus control group



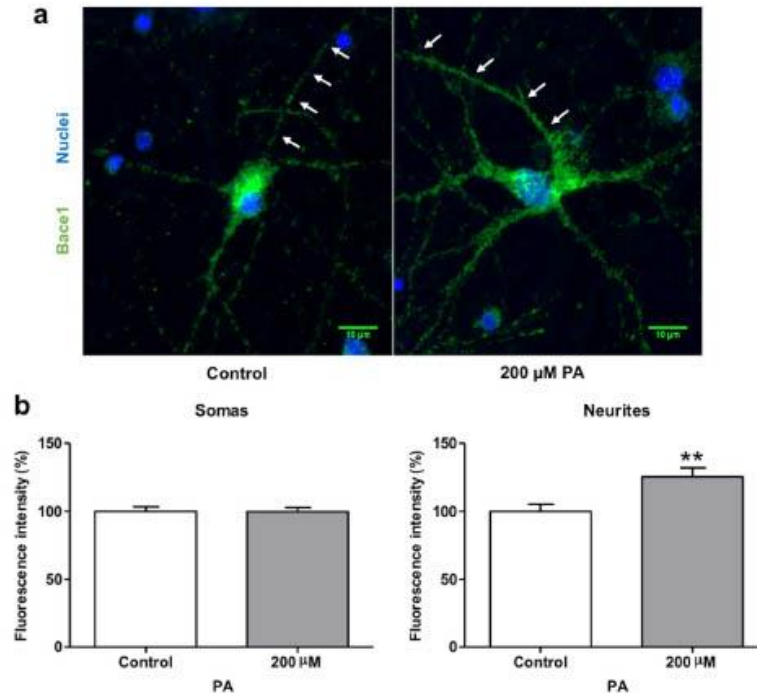
model. Here, we found similar results for a PA-induced BACE1 increase associated with the induction of a transcriptionally active form of NF- κ B, but also related with SIRT1 downregulation. Deacetylation of the subunit p65-NF- κ B at lysine 310 by SIRT1 inhibits its nuclear localization, and, therefore, its transcriptional activity [34]. Here, we found that PA reduces the activity of SIRT1 by measuring the acetylation of p65 at lysine 310, which can activate p65 and subsequently increase the transcription of *Bace1*. This conclusion is supported by different findings that demonstrate the transcriptional regulation of *Bace1* by NF- κ B [57–61].

We extend the above results, showing changes in the spatial distribution of BACE1, which are fundamental for A β production [61]. Given that BACE1 compartmentalization

and intracellular trafficking depends on posttranscriptional S-palmitoylation [62], it is plausible that an increased load of PA could be involved in the posttranscriptional modification that modulates the axonal location of this enzyme where it exerts its enzymatic activity, promoting the upregulation of the amyloidogenic pathway observed in AD.

The present results provide new evidence regarding the PA-dependent NAD⁺ depletion that results in SIRT1 dysfunction and NF- κ B activation as an additional mechanism associated with the expression of BACE1. In addition, this study suggests a role for PA in the trafficking and neuronal distribution of BACE1, which may contribute to neuronal amyloid production.

Fig. 5 Fluorescence detection of BACE1 after PA exposure. BACE1 protein was observed in a control hippocampal neuron, mainly located in the soma (a, left panel). After PA 200 μ M for 24 h, BACE1 protein concentrated into the neurites (a, right panel). Quantification of the fluorescence intensity of the soma or in 50 μ M of neurite is depicted in (b). Green = BACE1, blue = nucleus, and arrows show the neurite that was randomly selected to quantify the fluorescence intensity. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 20 neurons per condition of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$ versus control group (Color figure online)



Acknowledgements This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (PAPIIT IN202615). The authors thank Patricia Ferrera for technical assistance and Miguel Tapia-Rodríguez for confocal microscopy assistance. M Flores-León is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACYT (449712).

Compliance with ethical standards

Conflict of Interest The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethical approval All procedures involving animals in this study were performed in accordance with the Regulations for Research in Health Matters (México) and with the approval of the local Animal Care Committee.

References

- Boden G, Shulman GI (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32:14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x>
- Umegaki H (2010) Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 39:8–10. <https://doi.org/10.1093/ageing/afp211>
- Schrijvers EMC, Wittman JCM, Sijbrands EJJ et al (2010) Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam study. *Neurology* 75:1982–1987. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ff44f6>
- Sima AAF (2010) Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* 47:279–293. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0218-0>
- Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y et al (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75:764–770. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181eee25f>
- Viscogliosi G, Andreozzi P, Chiriac IM et al (2012) Screening cognition in the elderly with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 10:358–362. <https://doi.org/10.1089/met.2012.0043>
- Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A (2013) Diabetes mellitus and risk of dementia: a meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig* 4:640–650. <https://doi.org/10.1111/jdi.12087>
- Hoscheidt SM, Starks EJ, Oh JM et al (2016) Insulin resistance is associated with increased levels of cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease and reduced memory function in at-risk healthy middle-aged adults. *J Alzheimer's Dis* 52:1373–1383. <https://doi.org/10.3233/JAD-160110>
- Kwon B, Lee HK, Querfurth HW (2014) Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta* 1843:1402–1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbancr.2014.04.004>
- Calvo-Ochoa E, Sánchez-Alegría K, Gómez-Inclán C et al (2017) Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits

- insulin/PI3 K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: the role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem Int* 110:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>
11. Hsiao YH, Lin CI, Liao H et al (2014) Palmitic acid-induced neuron cell cycle G2/M arrest and endoplasmic reticular stress through protein palmitoylation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci* 15:20876–20899. <https://doi.org/10.3390/ijms151120876>
 12. Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR et al (2015) Proteasome dysfunction associated to oxidative stress and proteotoxicity in adipocytes compromises insulin sensitivity in human obesity. *Antioxid Redox Signal* 23:597–612. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5939>
 13. Marwarha G, Claycombe K, Schommer J et al (2016) Palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent C/EBP α homologous protein activation attenuates leptin and insulin-like growth factor 1 expression in the brain. *Cell Signal* 28:1789–1805. <https://doi.org/10.1016/j.celsig.2016.08.012>
 14. Marwarha G, Schommer J, Lund J et al (2018) Palmitate-induced C/EBP homologous protein activation leads to NF- κ B-mediated increase in BACE1 activity and amyloid beta genesis. *J Neurochem* 144:761–779. <https://doi.org/10.1111/jnc.14292>
 15. Little JP, Madeira JM, Klegeris A (2012) The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation. *J Alzheimer's Dis* 30:S179–S183. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111262>
 16. Yaku K, Okabe K, Nakagawa T (2018) NAD metabolism: implications in aging and longevity. *Ageing Res Rev* 47:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.05.006>
 17. Smith JJ, Kenney RD, Gagne DJ et al (2009) Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by caloric restriction in vivo. *BMC Syst Biol* 3:31. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-31>
 18. Hubbard BP, Sinclair DA (2013) Measurement of sirtuin enzyme activity using a substrate-agnostic fluorometric nicotinamide assay. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_11
 19. Hubbard BP, Sinclair DA (2014) Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* 35:146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>
 20. Imai SI, Guarente L (2014) NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol* 24:464–471. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.002>
 21. Morris BJ (2013) Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med* 56:133–171. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525>
 22. Kumar R, Chatterjee P, Sharma PK et al (2013) Sirtuin1: a promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061560>
 23. Lutz MI, Milenkovic I, Regelsberger G, Kovacs GG (2014) Distinct patterns of sirtuin expression during progression of Alzheimer's disease. *NeuroMolecular Med*. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8288-8>
 24. Braidy N, Jayasena T, Poljak A, Sachdev PS (2012) Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry* 25:226–230. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835112c1>
 25. Vassar R (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
 26. De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113:1857–1870
 27. Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L (2010) SIRT1 suppresses β -amyloid production by activating the α -secretase gene ADAM10. *Cell* 142:320–332. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.020>
 28. Bonda DJ, Lee H, Camins A et al (2011) The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 10:275–279. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70013-8)
 29. Hernández-Fonseca K, Massieu L (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82:196–205. <https://doi.org/10.1002/jnr.20631>
 30. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
 31. Clore JN, Allred J, White D et al (2002) The role of plasma fatty acid composition in endogenous glucose production in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 51:1471–1477. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.35202>
 32. Schönfeld P, Reiser G (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1493–1499. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
 33. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V (2014) Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int* 2014:1–22. <https://doi.org/10.1155/2014/472459>
 34. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS et al (2004) Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369–2380. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>
 35. Marwarha G, Raza S, Meiers C, Ghribi O (2014) Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- β genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1842:1587–1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2014.05.015>
 36. Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ et al (2000) Maturation and endosomal targeting of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem* 275:33729–33737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004175200>
 37. Deng M, He W, Tan Y et al (2013) Increased expression of reticulon 3 in neurons leads to reduced axonal transport of β site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.480079>
 38. Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA et al (2013) The Alzheimer's β -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol*. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1152-3>
 39. Shi Y, Sun Y, Sun X et al (2018) Up-regulation of HO-1 by Nrf2 activation protects against palmitic acid-induced ROS increase in human neuroblastoma BE(2)-M17 cells. *Nutr Res*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.02.003>
 40. Sergi D, Morris AC, Kahn DE et al (2018) Palmitic acid triggers inflammatory responses in N42 cultured hypothalamic cells partially via ceramide synthesis but not via TLR4. *Nutr Neurosci*. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1501533>
 41. Dhopeswarkar GA, Subramanian C, McConnell DH, Mead JF (1972) Fatty acid transport into the brain. *BBA*. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(72\)90161-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90161-7)
 42. Fraser T, Tayler H, Love S (2010) Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0087-5>

43. Wanders RJA, Waterham HR (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75:295–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>
44. Berger J, Dorninger F, Forss-Petter S, Kunze M (2016) Peroxisomes in brain development and function. *Biochim Biophys Acta* 5:4. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.005>
45. Vanhove G, Van Veldhoven PP, Vanhoutte F et al (1991) Mitochondrial and peroxisomal beta oxidation of the branched chain fatty acid 2-methylpalmitate in rat liver. *J Biol Chem* 266:24670–24675
46. Liu L, Martin R, Chan C (2013) Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol Aging* 34:540–550. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.017>
47. Rahman M, Nirala NK, Singh A et al (2014) Drosophila sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase β and regulates complex V activity. *J Cell Biol* 206:289–305. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404118>
48. Imai SI, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795–800. <https://doi.org/10.1038/35001622>
49. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY et al (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205670200>
50. Revollo JR, Grimm AA, Imai SI (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 5:4. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200>
51. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J et al (2013) Antagonistic cross-talk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* 25:1939–1948. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.007>
52. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L (2010) Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Metab* 299:E1096–E1105. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00238.2010>
53. De Kreutzenberg SV, Ceolotto G, Papparella I et al (2010) Down-regulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes* 59:1006–1015. <https://doi.org/10.2337/db09-1187>
54. Caito S, Rajendrasozhan S, Cook Set al (2010) SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB J* 24:3145–3159. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151308>
55. Milner J (2009) Cellular regulation of SIRT1. *Curr Pharm Des* 15:39–44. <https://doi.org/10.2174/138161209787185841>
56. Cao L, Liu C, Wang F, Wang H (2013) SIRT1 negatively regulates amyloid-beta-induced inflammation via the NF- κ B pathway. *Braz J Med Biol Res* 46:659–669. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132903>
57. Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C et al (2007) Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor- κ B in neurons and glia upon exposure to β -amyloid peptides. *J Neurosci Res* 85:1194–1204. <https://doi.org/10.1002/jnr.21252>
58. Chen CH, Zhou W, Liu S et al (2012) Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:77–90. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000149>
59. Chami L, Buggia-Prévoit V, Duplan E et al (2012) Nuclear factor- κ B regulates β APP and β - and γ -secretases differently at physiological and supraphysiological A β concentrations. *J Biol Chem* 287:24573–24584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333054>
60. Wang R, Li JJ, Diao S et al (2013) Metabolic stress modulates Alzheimer's β -secretase gene transcription via SIRT1-PPAR γ -PGC-1 in neurons. *Cell Metab* 17:685–694. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.016>
61. Ben Halima S, Mishra S, Raja KMP et al (2016) Specific inhibition of β -secretase processing of the Alzheimer disease amyloid precursor protein. *Cell Rep* 14:2127–2141. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.076>
62. Andrew RJ, Fernandez CG, Stanley M et al (2017) Lack of BACE1 S-palmitoylation reduces amyloid burden and mitigates memory deficits in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 114:201708568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708568114>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

11.6 Anexo 6: Transcriptional Profiles Reveal Deregulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid.

Molecular Neurobiology
https://doi.org/10.1007/s12035-021-02434-6



Transcriptional Profiles Reveal Deregulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid

M. Flores-León¹ · N. Alcaraz^{2,3} · M. Pérez-Domínguez¹ · K. Torres-Arciga⁴ · R. Rebollar-Vega⁵ · I. A. De la Rosa-Velázquez^{5,6} · C. Arriaga-Canon⁴ · L. A. Herrera^{3,4} · Clorinda Artas¹ · Rodrigo González-Barrios⁴

Received: 11 March 2021 / Accepted: 18 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

The effects of the consumption of high-fat diets (HFD) have been studied to unravel the molecular pathways they are altering in order to understand the link between increased caloric intake, metabolic diseases, and the risk of cognitive dysfunction. The saturated fatty acid, palmitic acid (PA), is the main component of HFD and it has been found increased in the circulation of obese and diabetic people. In the central nervous system, PA has been associated with inflammatory responses in astrocytes, but the effects on neurons exposed to it have not been largely investigated. Given that PA affects a variety of metabolic pathways, we aimed to analyze the transcriptomic profile activated by this fatty acid to shed light on the mechanisms of neuronal dysfunction. In the current study, we profiled the transcriptome response after PA exposition at non-toxic doses in primary hippocampal neurons. Gene ontology and Reactome pathway analysis revealed a pattern of gene expression which is associated with inflammatory pathways, and importantly, with the activation of lipid metabolism that is considered not very active in neurons. Validation by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of *Hmgcs2*, *Angptl4*, *Ugt8*, and *Rnfl45* support the results obtained by RNAseq. Overall, these findings suggest that neurons are able to respond to saturated fatty acids changing the expression pattern of genes associated with inflammatory response and lipid utilization that may be involved in the neuronal damage associated with metabolic diseases.

Keywords Palmitic acid · RNAseq · Hippocampal neurons · Neuroinflammation · Lipid metabolism

Introduction

The chronic consumption of high-fat diets (HFD) has been involved in the development of several pathological conditions such as obesity, type-2 diabetes, and even cognitive

impairments that may lead to dementia [1–5]. Different components of the HFD have been studied to unravel the molecular pathways they are altering in order to understand the link between increased caloric uptake and cellular dysfunction. The most abundant saturated fatty acid

✉ Clorinda Artas
carias@unam.mx

✉ Rodrigo González-Barrios
rodrigop@ciencias.unam.mx

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

² The Bioinformatics Centre. Department of Biology, University of Copenhagen, Ole Maaloes Vej 5, DK-2200 Copenhagen N, Denmark

³ Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, CP 14610 Mexico City, Mexico

⁴ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Avenida San Fernando No. 22, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080 Mexico City, Mexico

⁵ Genomics Laboratory, Red de Apoyo a La Investigación - CIC, Universidad Nacional Autónoma de México, INMCNSZ, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Secc. 16, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

⁶ Present Address: Next Generation Sequencing Core Facility, Helmholtz Zentrum Muenchen, Ingolstaedter Landstr 1, 85754 Neuherberg, Germany

present in the HFD is palmitic acid (PA) which was found to be increased in the circulation of obese and diabetic people [6–8]. The deleterious effects of the exposure to PA have been extensively studied in peripheral tissues; mainly in the liver, muscle, and pancreas [9]. The reported effects have been associated with insulin resistance, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, and systemic inflammation [10–13]. Few studies have addressed the mechanisms for such deleterious effects, using transcriptome studies. For instance, in cultured human hepatocytes, genes linked to lipid transport, lipogenesis, lipid droplet growth, glucose, and fatty acid metabolism have been shown to be upregulated after PA exposure [14]. Similar results were obtained in primary cultures of human pancreatic islets, where genes related to glucose and lipid metabolism were upregulated after PA exposure at non-toxic dose [15]. Another group reported the transcriptomic effect of PA in a myoblast cell line model. These authors found alterations in several pathways such as interleukin, apoptosis, and insulin/PI3K signaling, among others, that are important for the ability to respond to hormones, cytokines, and metabolism [16].

However, little is known regarding PA effects in neurons. This is an important question to be resolved in view of the dramatic and chronic increase in the intake of HFD and PA in modern life that has become a risk to the healthy brain function. In the brain, the astrocytes are the main cells responsible of fatty acid oxidation, but information on the metabolic responses of neurons when exposed to a high concentration of PA is still scarce [17, 18]. Although it is generally accepted that neuronal energy demands rely exclusively in glucose oxidation and that fatty acids are not largely metabolized, recent evidence points that neurons may use both glucose and fatty acids for ATP production under specific conditions [19]. In this regard, a study with hypothalamic neurons has demonstrated that they are able to sense and metabolize long-chain free fatty acids to produce ATP by mitochondrial β -oxidation. The increased cellular levels of ATP close the K_{ATP} channels causing neuronal depolarization, involved in the hypothalamic control of energy balance of the body [20]. Furthermore, in hippocampal neurons and in differentiated human neuroblastoma cells, PA induces a reduction of the $NAD^+/NADH$ ratio, and the activity and expression of the energy-sensing molecule, Sirtuin-1, are compromised and insulin resistance is generated [21, 22]. These reported effects strongly suggest the metabolization of fatty acids by neurons under specific stress conditions, such as high concentrations of PA. Additionally, one of the brain regions with high plasticity and metabolic rate is the hippocampus. The cells in this structure are particularly vulnerable to deleterious conditions such as exposure to the components of HFD, neurodegeneration, and aging [23–25]. Given this, it is important to shed light on the consequences

of the harmful effects of saturated fatty acids in these particular neurons.

To our knowledge, there is no reported evidence about the transcriptomic response and characterization of how the cellular program of a neuron integrates the pleiotropic effects of the exposure to PA. In the current study, we looked for the response in gene transcription after neuronal exposure to PA in non-toxic doses. By generating transcription profiles through an RNA sequencing approach, we observe the signaling pathways and neuronal responses that are consequently altered by the exposure to this saturated fatty acid.

Methods

Cell Culture and PA Treatment

Primary hippocampal neuronal cultures were prepared from Wistar rat brains obtained from 17-day-old embryos as previously reported [22]. Animals were handled with all precautions necessary to diminish their suffering consistent with the Regulations for Research in Health Matters (Mexico) and with the approval of the local Animal Care Committee. Briefly, hippocampi were dissected, minced with a scalpel in Krebs solution (121 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25.4 mM $NaHCO_3$, 14.2 mM Glucose, 0.004 mM Phenol Red), and incubated with 0.25% trypsin at 37 °C for 10 min. The hippocampi were mechanically dissociated using a cell strainer (Corning®), and the cellular suspension was homogenized in neurobasal medium (Gibco 21103049) supplemented with 2% B27 (Gibco 17504044), 0.5 mM L-Glutamine (Gibco 25030–081) and 20 μ g/mL penicillin/streptomycin (Gibco 15140–122). For Oil Red O staining, hippocampal neurons were plated at 1.97×10^5 cells/cm² density on 12 well plates; for RNA extraction, cells were plated at 1.6×10^5 cells/cm² density on 60 mm in plastic dishes; and for immunodetection, neurons were plated at 1.97×10^5 cells/cm² density on 12 well plates with glass coverslips. Every plate and coverslip were previously coated with 10 μ g/mL poly-L-lysine for 24 h. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added to cultures 3 days after plating to inhibit the growth of non-neuronal cells. The astrocyte population in these cultures is near 5% as measured by immunofluorescence against the glial fibrillary acidic protein. Hippocampal neurons were used for experiments after 12 days in vitro (DIV) and were maintained at 37 °C in a humidified 5% $CO_2/95\%$ air atmosphere. After the 12 DIV, PA (Sigma-Aldrich) or vehicle as a control condition (BSA/PBS) was added for 24 h. PA was prepared as a stock solution in ethanol and the working solution was prepared the same day of use in 10% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich A9647)/phosphate-buffered saline (PBS) and was incubated at 37 °C for at least 2 h before adding it to the cell cultures.

Oil Red O Staining Quantification

Lipid droplet detection was performed by Oil Red O (Sigma-Aldrich) staining. Oil Red O was prepared as a stock solution 5% in isopropanol in constant agitation overnight at 4 °C. Afterwards, the solution was filtrated through a Whatmann® Filter and a 6:4 (Oil Red O/Mili-Q water) was prepared and incubated at room temperature (RT) at least 20 min before its use. The solution was filtrated through a 0.2 µm Millex-GP® Filter. For the Oil Red O staining, cell culture medium was removed; the cells were washed twice with PBS and were fixed immediately with PFA 4%/PBS overnight at 4 °C. Afterwards, PFA was removed, and they were washed twice with PBS and once with isopropanol 60%. Then, cells were left to dry and when they were completely dry, Oil Red O stain was added and incubated for 2 h. Finally, the Oil Red O stain was removed, and the cells were washed with bidistilled water until background staining was removed. For its quantification, pure isopropanol was added, and the Oil Red O stain was solubilized. The final solution was read in a multiplate reader at 520 nm.

RNA Extraction

Total RNA was isolated using TRIzol™ reagent (Thermo Fisher Scientific) as specified by the manufacturer and cDNA was synthesized from 200 ng of RNA using the High Capacity, cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher, 4374966) with random primers. The quantification of total RNA was achieved using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The integrity of RNA was assessed by Agarose-Gel Electrophoresis.

RNA Sequencing

RNA was quantified using Qubit 2.0 (Invitrogen, USA) and quality was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Only samples with an RNA Integrity Number (RIN) > 8.0 were used. Libraries were constructed using 500 ng of RNA, using the Truseq Stranded mRNA library prep kit from Illumina according to the manufacturer's instruction. The libraries were sequenced using an Illumina HiSeq2500 equipment (Illumina, Inc.) in Pair-end (2 × 125 bases). Depth of sequencing was > 25 million reads.

RNA-Seq Analysis

Adapter trimming and low-quality reads were filtered out using trimmomatic v.0.39 [26]. Reads were mapped to the rat genome with STAR v.2.7.1a [27], and also to the rat transcriptome with salmon v.0.14.1 [28], using assembly version Rnor6 with ensembl annotations version 6.0.95. Gene level counts from reads mapped to the genome were

quantified using featureCounts in the rsubread [29] package. Differential expression analysis was performed with DESeq2 [30] and edgeR [31], with a paired design ~ specimen + treatment. Differentially expressed genes were defined as having FDR < 0.1 and |Log2FC| > 0.5. Low expressed genes were filtered out before edgeR using the filterByExpr function and the design matrix. GO term and pathway overrepresentation were performed with the clusterProfiler [32] Bioconductor package on all genes found DE in at least one of the 4 workflows using all expressed genes as background. Gene set enrichment analysis [33] was performed on all expressed genes ordered by their DE - log10 *p* value.

Quantitative RT-PCR

It was performed using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, K0221) in a QuantStudio 3 (Applied Biosystems). All reactions were performed five or seven times, and the expression was normalized using the *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* mRNA. The sequences of the primers used are listed in Table 1.

Immunofluorescence and Image Analysis

After different PA treatments, the cell culture media was removed, and cells were washed three times with ice-cold PBS. Then, the cells were fixed with ice-cold PFA 1%/PBS for 5 min and washed three times with PBS. Afterwards, cells were permeabilized in 0.3% Triton X-100/PBS for 30 min at RT. Then, cells were incubated in blocking solution (BSA 4%/PBS) with gentle agitation for 1 h at RT. Next, cells were incubated with anti-MAP2 antibody (1:1000, Millipore #MAB378) in blocking solution for 48 h at 4 °C. After washing three times in 0.3% Triton X-100/PBS, cells were incubated with secondary antibody (1:1000, Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse Invitrogen # A21202) in blocking solution for 2 h, at RT. Immediately after incubation with the secondary antibody, nuclei were stained with Hoechst

Table 1 Primer sequences that were used for gene quantification

Gene	Sequence
<i>Angpt4</i>	F: 5'-GGACCTTAACCTGTGCCAAGA-3' R: 5'-TTTCCAGAAGATCCCCTTT-3'
<i>Hmgcs2</i>	F: 5'-ACCTTGAACGAGTGGATGAG-3' R: 5'-CACCGCAGAGCAGATCCTAT-3'
<i>Rnfl45</i>	F: 5'-TTACAACGTGTGGCTTCGTG-3' R: 5'-GATCACAGCGGATTCATGTC-3'
<i>Ugr8</i>	F: 5'-AGTACAGCGGAAAGGCATGG-3' R: 5'-ATCTGATGGACAGCCGAACG-3'
<i>Gapdh</i>	F: 5'-GCCTGGAGAAACCTGCCAA-3' R: 5'-CTTAGTGGGCCCTCGGC-3'

(1:1000) in PBS for 10 min at RT. Cells were washed three times with PBS and covered with fluorescent mounting medium (DAKO). Negative controls were performed excluding the primary antibodies from the procedure. Observations were performed on a Nikon A1R + confocal microscope (Nikon Instruments Inc.) with a Plan Apo 20 \times (N.A. 0.75) and Plan Apo 60 \times water (N.A. 1.2) objectives and digital images were obtained with the NIS-Elements C imaging software (Nikon).

Statistical Analysis

For the gene expression and oil red experiments, a two-tailed unpaired Student's *t* test was performed using a GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). All values are expressed as mean \pm SEM.

Results

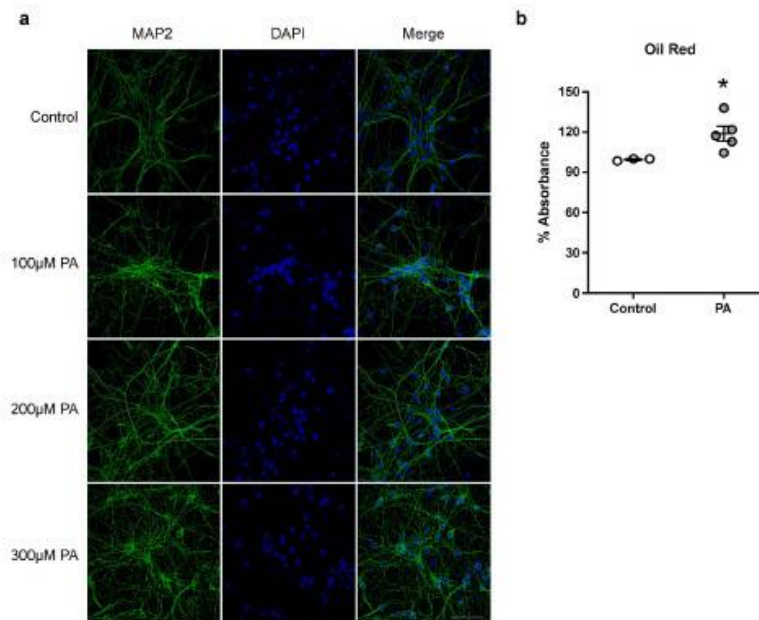
PA Exposure Changes the Transcriptional Profile Without Modifying the Neuronal Morphology

To characterize the morphological consequences and neurite integrity after 24 h of exposure to PA, we first performed a qualitative analysis of the distribution of the cytoskeletal protein MAP2 in the hippocampal neurons (Fig. 1a). As

shown, the MAP2 immunodetection was located mainly in the neurites, scarcely found in the neuronal soma and we did not observe evident effects on the neuronal morphology with 100 and 200 μ M PA compared to the control condition. However, neurons exposed to 300 μ M of PA showed a slight increase in the concentration of MAP2 into the soma and a fragmented pattern in the localization of this protein, suggesting dendritic blebbing. This distribution of MAP2 is consistent with the induction of localized swelling and may indicate toxic effects of PA at concentrations of 300 μ M and above. To estimate the neuronal lipid content after PA exposure, we stained neurons with Oil Red. Spectrophotometric quantification showed that PA caused an increase in the neuronal content of lipid droplets (Fig. 1b), demonstrating the uptake and metabolism of this saturated fatty acid by hippocampal neurons. Although the presence of glial cells in the cell cultures is scarce and only represent approximately 5%, we cannot rule out their contribution in the observed effects in the Oil Red quantification. Hence, considering this effect and previous viability assays [22], we continued the experiments with the dose of 200 μ M PA.

Given that the fatty acids per se can alter gene regulation in periphery cells and knowing that PA has pleiotropic effects, we then asked to what extent hippocampal neurons modify their transcriptomic profile after PA exposure. By RNAseq after 24 h of 200 μ M PA, since different mapping methods can have different transcript detection sensitivities [34], we mapped sequences to both the rat's genome

Fig. 1 Palmitic acid-induced changes on neurites morphology and increases the lipid body content in cultured hippocampal neurons. **a** Representative images of MAP2 immunolabeling (green) and DAPI stained nuclei (blue) obtained with confocal microscopy showing neurites morphology in cultured hippocampal neurons treated for 24 h with vehicle, 100 μ M, 200 μ M, and 300 μ M PA. For each panel, confocal images were obtained with a \times 60 objective. **b** Quantification of Oil Red staining by spectrophotometry. Treatment for 24 h with PA 200 μ M raises the content of lipid bodies compared to control conditions. * $p \leq 0.005$. $N = 3$



and transcriptome. In addition, for each mapping and gene quantification method, we used two well-established methods (DESeq2 and edgeR) for differential expression analyses, making a total of 4 different pipelines. This multiple analysis showed that the gene expression was not drastically altered (Fig. 2) and it revealed a total of 45 upregulated and 30 downregulated genes (Fig. 2a, b) in at least one pipeline. Genes such as *Angptl4*, *Ugt8*, *Hmgcs2*, *Ccl2*, and *Insig1* were shared between the different pipelines (Supplementary Table 1), which suggest that these genes are strongly affected in the neurons by PA.

Clustering of differentially expressed genes (DEGs) showed that each experimental condition in a group behaves with a similar expression pattern (Fig. 2c) and suggests that the exposure to PA can cluster experimental conditions into two different groups but that between individuals, there are specific changes and alterations. Furthermore, as shown in the differential expression analysis (Fig. 2c, d), not only protein-coding genes are deregulated by this exposure but also long non-coding intergenic RNAs (LincRNAs) and small nuclear RNAs (snRNAs). All together these findings demonstrate that PA exposure is sufficient to induce changes in the transcriptional profile of neurons, suggesting that cellular mechanisms, even those involved in nuclear function, are being altered.

Changes in Neuronal Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways Are Induced by PA

To determine the biological processes and the DEGs that are modified after the PA exposure, we performed pathway enrichment analyses. Gene Ontology (GO) enrichment analysis (Fig. 3a) showed that among the top 20 functionally enriched biological processes the chemokine-mediated signaling pathway, fatty acid and chemokine responses, cholesterol biosynthetic pathway, and insulin function were altered during this exposure, indicating that these processes are importantly involved in the neuronal response to PA.

In order to determine the relationships between enriched GO terms and DEGs, we constructed an interaction network using the clusterProfiler R package (Fig. 3c). We observe that the network forms a single-connected component, pointing that most genes are GO terms closely related and work together in similar processes. In this regard, *Hmgcs2* and *Insig1* are part of an important node for energy metabolism since it is known they are involved in the response to fatty acid, insulin, starvation, and cholesterol biosynthesis. The interaction network also showed that genes, such as *Ccl2*, involved in the cellular response to chemokines and the chemokine-mediated signaling pathway are related to lipid metabolism. These results suggest that PA might be

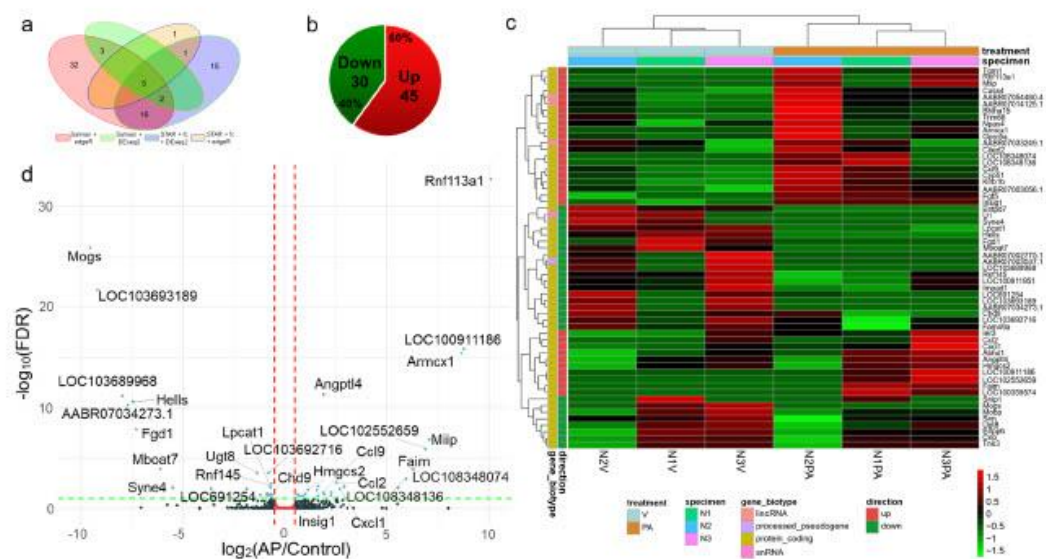


Fig. 2 Transcriptome analysis of hippocampal neurons exposed to PA. **a** Number of DEG found with the RNAseq employing different pipelines. **b** Pie chart depicting the total number and percentage of differentially down- and upregulated genes found by RNAseq analysis.

c Heat map showing the clustering of control group (V) vs. the PA exposed hippocampal neurons. **d** Volcano plot of DEG. Genes not significantly different are depicted by dark-colored dots

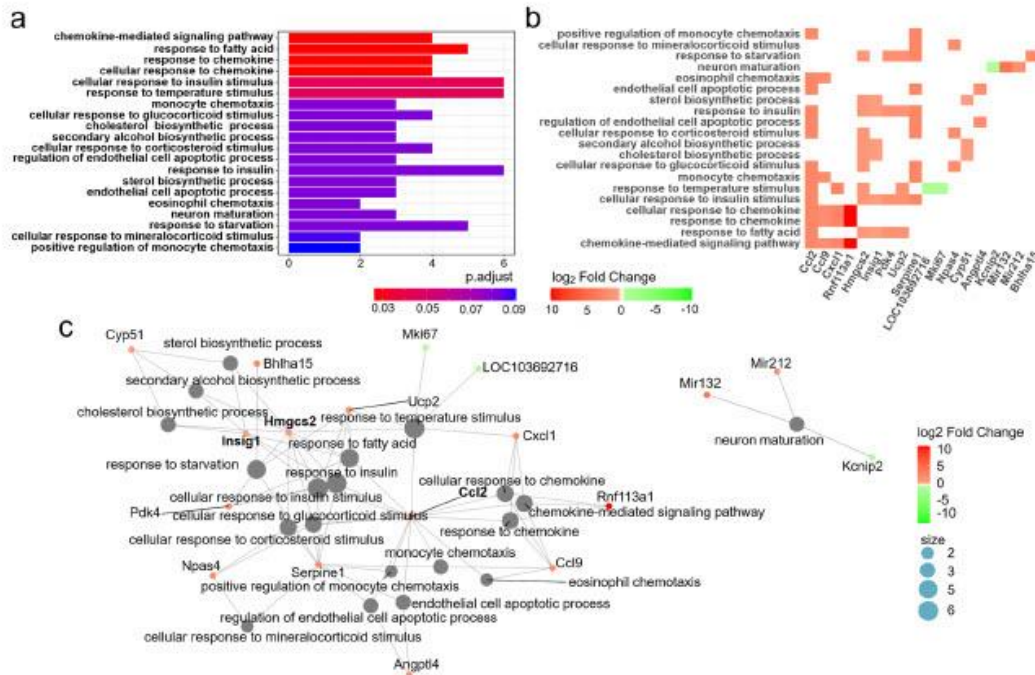


Fig. 3 GO term enrichment analysis reveals metabolic and inflammatory processes altered in neurons after PA exposure. **a** Top 20 biological processes that were found to be significantly enriched (hypergeometric test FDR < 0.1) in response to PA exposure. **b** Heatmap of genes contained in the GO terms, each square represents the fold

change of individual genes (x-axis) and to which biological processes (y-axis) they are associated with. **c** Interaction network of genes and GO terms, where gray nodes represent pathways and the green to red color-scaled nodes are DE genes linking or associating them

altering the neuronal energy metabolism, particularly the lipid metabolism, and the inflammatory response through the induction of specific genes that are linked to both processes.

To further confirm and unravel some other biological processes affected by the exposure of neurons to PA, we performed the same enrichment analysis with Reactome [35] pathways (Fig. 4). This analysis confirmed the GO categories previously found not only by showing metabolism of lipids and the fatty acid cycle as important responsive pathways in neurons after PA exposure, but also revealed additional deregulated processes such as ion-channel transport and, strikingly, mitochondrial fatty acid beta-oxidation (Fig. 4a, b). The analysis of the interaction network showed that multiple genes involved in lipid metabolism are deregulated, such as *Ugt8*, *Cyp51*, *Acot1*, and *Echs1*, suggesting that the metabolism of lipids is one of the most relevant biological processes activated in response to PA (Fig. 4c). Furthermore, *Echs1* and *Acot1* also link the lipid metabolism with the mitochondrial beta-oxidation (Fig. 4c), which portrays them as important effectors in both processes. Overall,

together GO and Reactome enrichment analyses and the interaction networks strongly indicate that PA is affecting mainly lipid utilization pathways, which is interesting and unexpected because they are believed to be not completely active in neurons.

Genes Dependent on PPAR Signaling and Lipid Metabolism Are Deregulated in Neurons

GO term and pathway enrichment have the disadvantage that only DEGs are considered; however, other relevant processes may be driven by subtle changes in multiple genes of the same biological pathway. In order to elucidate these, we performed gene set enrichment analysis (GSEA) which takes into account the whole list genes, both on KEGG [36] pathways (Fig. 5) and GO term gene sets (Supplementary Fig. 1). First, we found that after PA exposure, the IL-17, TNF, and MAPK signaling pathways are deregulated (Fig. 5), suggesting that PA triggers inflammatory components in neurons. It is also shown that the fatty acid metabolism and catabolism

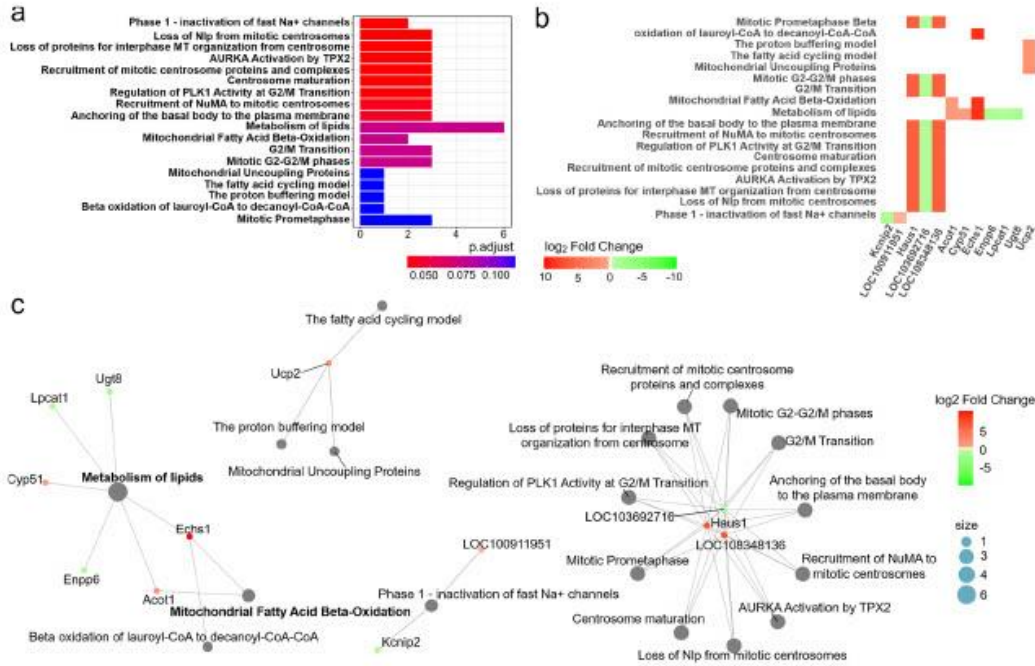
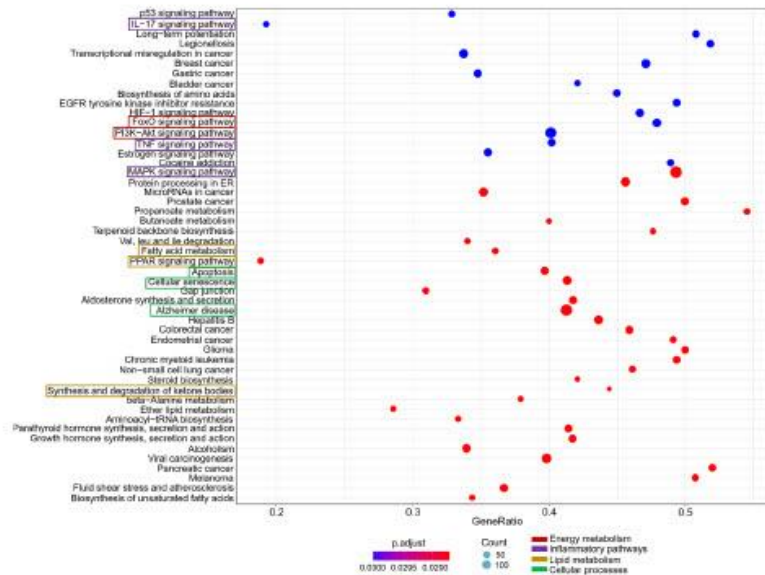


Fig. 4 Reactome pathway enrichment analysis reveals metabolic and lipid processes altered in neurons when exposed to PA. **a** Top Reactome pathways that were found to be significantly enriched (hypergeometric test FDR < 0.1) in response to PA exposure. **b** Heatmap of genes contained in the GO terms. Each square represents the fold

change of individual genes (x-axis) and to which pathways (y-axis) it is associated with. **c** Interaction network of genes and pathways, where gray nodes represent pathways and the green to red color-coded nodes are DE genes linking or associating them

Fig. 5 Gene set enrichment analysis (GSEA) of KEGG. The top pathways and biological processes analyzed by KEGG (y-axis) and the number of genes involved in each process that are altered (x-axis) are depicted in the graph. The affected metabolic pathways (red rectangles), lipid processes (yellow rectangles), immunological pathways (purple rectangles), and other important biological and cellular processes (green rectangles) when neurons are exposed to PA are highlighted



(Fig. 5 and Supplementary Fig. 1), PPAR signaling pathway, the synthesis of ketone bodies (Fig. 5), cholesterol biosynthetic and metabolic processes (Supplementary Fig. 1) are likewise affected. This result indicates that neurons have lipid metabolism elements that sense and respond to a high dose of saturated fatty acids. Additionally, this analysis showed that PA can affect general cellular and biological processes like apoptosis and cellular senescence (Fig. 5), as well as specific neuronal processes like ensheathment of neurons and axons, axonogenesis and regulation of neurotransmitter levels (Supplementary Fig. 1).

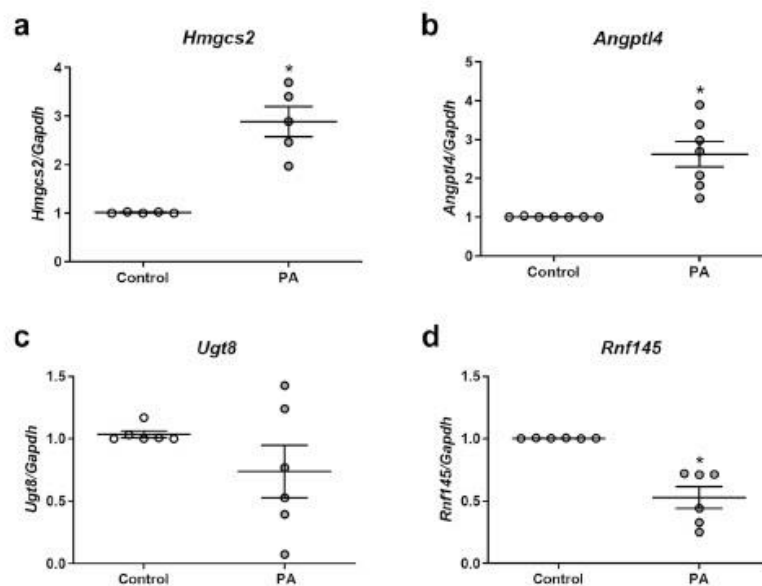
In order to validate the results obtained by the RNAseq and to show that the PPAR signaling pathway is responding to the PA stimulus, we analyzed 4 genes by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). *Hmgcs2* and *Angptl4* are two genes implicated in lipid metabolism and regulated by the PPAR signaling pathway. Their mRNA quantification by qRT-PCR showed that both genes (Fig. 6a, b) are significantly increased in the hippocampal neurons that were exposed to 200 μ M PA compared to the control condition. On the other hand, *Ugt8* and *Rnf145*, two other genes implicated in lipid metabolism but not regulated by the PPAR signaling pathway, were downregulated (Fig. 6c, d). Overall, these results and the presence of lipid bodies (Fig. 1b) demonstrate that when exposed to PA, neurons modify their transcriptional profile affecting the lipid metabolism through signaling pathways that are known to respond to fatty acid stimulus in periphery cells.

Discussion

The intake of HFD has been associated with the development of metabolic diseases and to the onset of neurodegenerative diseases [37–41]. These types of diets harbor PA as one of the main saturated fatty acids [42–44]. Although several mechanisms regarding its effects have been characterized in peripheral tissues [10–13], it remains poorly understood the neuronal responses activated by PA. Despite evidence that neurons are barely able to metabolize and respond directly to saturated fatty acids, new reports have shown that these cells are affected by pathological concentrations of PA [21, 22]. Additionally, it is known that the PA has pleiotropic effects since it can bind to transcription factors, activate signaling pathways through membrane-bound or nuclear receptors, be used in energy metabolism or as a precursor in the synthesis of other molecules, among other described effects [45]. Here we showed several functional pathways and cellular processes that are altered in neurons exposed to a non-toxic but a high concentration of PA, particularly those involved in lipid metabolism, insulin signaling and inflammatory responses.

As shown in the GSEA of KEGG pathways analysis, signaling through IL-17 is one of the most sensitive pathways activated in neurons after PA exposure. This signaling pathway belongs to the pro-inflammatory response well characterized mainly in T-cells and macrophages [46–49], as well as in hypothalamic neurons [50]. The family of

Fig. 6 Expression levels of *Hmgcs2*, *Angptl4*, *Ugt8*, and *Rnf145* after 24 h of 200 μ M PA treatment. The analysis of expression by qRT-PCR shows that when neurons are exposed to 200 μ M PA, both **a** *Hmgcs2* and **b** *Angptl4* are overexpressed, while both **c** *Ugt8* and **d** *Rnf145* are downregulated compared to the control group. Biological replicates were performed at least five times with $*p \leq 0.005$



transcription factors NF- κ B has been implicated in the IL-17 signaling and in the regulation of other pathways and transcription factors such as p53, MAPK, and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) [51–54]. Interestingly, we have previously found that PA increases the acetylated form of p65 in hippocampal neurons, which might be involved in the regulation of IL-17 effects [22]. Furthermore, it has been reported that PA can also trigger inflammatory response through the Toll-Like Receptor 4 (TLR4) inducing the transcriptional activity of p65 [55, 56]. In addition, p65 is also a central component of the inflammatory response of the inflammasome, NLRP3 [57]. It is known that the NLRP3 can be induced not only by p65 activation but also by external stimuli that can bind to the TLR4 and/or generate ER stress, mitochondrial dysfunction, and ROS elevation [56–58]. In this regard, the GSEA shows that several of these mechanisms are being impacted in hippocampal neurons, suggesting that neurons could be responding to the presence of high PA concentrations through this inflammatory component.

On the other hand, it is known that one of the characteristics of the inflammasome response is cytoplasmic swelling due to the ion influx/efflux. Additionally, MAPK is an important signaling pathway that can be regulated by inflammatory stimuli, and usually, it is activated along with these inflammatory pathways; either by a direct phosphorylation of p65 by p38 or through the activation of JNK [59, 60]. Our results show that all of these pathways are altered when neurons are exposed to PA and are significantly involved in the response to this saturated fatty acid. The inflammatory response might be correlated to the dendritic bebbing we observed when neurons were exposed to cytotoxic concentrations of PA. Thus, present results provide useful evidence about the inflammatory reaction that PA may exert on neurons giving support to the hypothesis regarding the role of PA in the induction of chronic neuronal damage.

Besides the inflammatory process, we have also found metabolic pathways that respond to the PA exposure. Previously, we have reported a diminished consumption of glucose and a reduction of the NAD⁺/NADH ratio after neuronal exposure to PA, suggesting that this saturated fatty acid can be used as energetic fuel by the neurons [22]. Although the utilization of saturated fatty acid as energy substrates for the brain is still controversial, the results from present analysis showed that neurons can respond to PA activating diverse lipid metabolic pathways to produce energy or to synthesize several other compounds. In this regard, it is well known that the PPAR nuclear transcription factor proteins can bind and respond to different types of lipids [61]. Particularly, it has been described in HepG2 cells that PA and the monosaturated fatty acid, oleic acid, can specifically bind and activate PPAR α and/or PPAR γ ,

in a time and concentration-dependent manner [62]. Furthermore, our results showed that many other metabolic pathways that respond to nutrients are also altered by PA, such as FoxO, PI3K-Akt, synthesis and degradation of ketone bodies, and cholesterol metabolism. Several research groups have reported similar effects of PA in different cell models when using RNAseq or microarrays [15, 16, 63–65]. These groups show an alteration of genes involved in the PPAR signaling pathway, fatty acid degradation, chemokine signaling pathway, inflammation pathways, beta-oxidation, insulin signaling, among others. In fact, we have previously reported that PA induces insulin resistance in neurons, similar to the one observed in periphery cells [21]. Thus, current results strongly suggest that these signaling networks and cellular processes are impacted by PA in different cell types.

Several genes encoding enzymes involved in lipid and energy metabolism were evaluated with qRT-PCR. One of the metabolic pathways that is used for energy production under fasting conditions is the ketone body synthesis. In this pathway, the mitochondrial enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase 2 (Hmgcs2) catalyzes the first reaction of ketogenesis and is activated in the presence of acetyl-CoA, mostly derived from mitochondrial beta-oxidation. The transcriptional control of this gene is mediated by fatty acids through PPAR binding [66]. Herein, we demonstrated that the transcript that encodes Hmgcs2 was upregulated, suggesting that this lipid-dependent pathway is being activated in the neurons. Another gene shown to be upregulated is *Angptl4*. Interestingly, this gene is also a target of PPAR and is induced under hypoxic conditions in various cell types. The encoded protein is a serum hormone directly involved in regulating lipid metabolism [67].

Interestingly, the other two genes that we measured by qRT-PCR, which are involved in lipid metabolism but not regulated by the PPAR transcription factor family, were found to be downregulated, *Ugt8* [68] and *Rnfl145* [69]. *Ugt8* is a brain-specific-key enzyme in the last step for the synthesis of galactocerebrosides [70, 71]. The recently characterized Rnfl145 enzyme is a E3-ubiquitin ligase involved in the homeostasis of cholesterol, negatively regulating this process when high levels of this protein are found in a cell [72, 73]. The downregulation of *Rnfl145* transcript suggests alterations in the cholesterol pathway leading to an increase of the cholesterol biosynthetic genes expression and the novo synthesis of cholesterol [72].

Since lipid metabolism remains controversial in neurons, the genes we have validated are mainly involved in this process. Nevertheless, previously, we have reported the activation of p65, a well-characterized transcription factor involved in inflammatory responses in hippocampal neurons

exposed to PA [22] as well as the effects of this saturated fatty acid on the insulin signaling [21]. Other research groups have also reported the induction of inflammatory mediators after neuronal exposure to PA [74]. Furthermore, transcriptional expression levels of different genes involved in PA effects on neurons showed a significant impact on different neuronal processes associated with apoptosis, senescence, and autophagy that are known to participate in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease.

Deregulation of synaptic function by PA exposure is a very interesting and current research topic in the field, since it can help unravel some mechanisms by which neurodegenerative diseases can be triggered by a HFD consumption. Interestingly, there are some research groups that have reported associated effects of HFD and PA to synaptic dysfunction through different mechanisms, mainly involving protein palmitoylation and pro-inflammatory mechanisms [74–77]. Few studies, such as the one published by Roy et al. (2016), identify lipid-binding transcription factors that are capable of modulating synaptic function [78]. In our study, GSEA of KEGG (Fig. 5) and GO terms (Supp. Figure 1) show that processes like long-term potentiation, a proposed mechanism underlying learning or memory, can be affected when hippocampal neurons are exposed to PA. Therefore, this first approach using a global analysis of gene expression can help to understand the pleiotropic effects of PA on neurons and the possible pathways activated under pathological conditions which may be involved in the deleterious effects of the consumption of saturated fatty acids.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02434-6>.

Acknowledgements The authors thank Q.F.B. Patricia Ferrera for her technical support and assistance.

Author Contribution MFL designed and performed experiments, analyzed data, prepared the figures, and drafted the manuscript; NA performed the bioinformatical data analyses, prepared figures, and reviewed the manuscript; MPD prepared the neuronal cultures and assisted with the confocal analysis; KTA assisted with the qRT-PCR experiments and prepared the figures; RRV prepared the sequencing libraries and performed the RNAseq; IARV performed the RNAseq and reviewed the manuscript; CAC contributed valuably to the discussion, writing and approval of manuscript; LAH contributed to the revision of the manuscript; CA and RGB funded, designed, and oversaw the whole project including experimental design, data analysis, drafting and reviewing the manuscript.

Funding This work was supported by CONACYT (CA, A1-S9559) (RG-B, 2900441) and partially supported by Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (PAPIIT IN202615). M Flores-León is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from Conacyt (449712). K Torres-Arciga is a master student from Posgrado en Ciencias biológicas, Universidad

Nacional Autónoma de México (UNAM) and acknowledges the support from CONACYT as a beneficiary of a scholarship (CVU1009360).

Data Availability The sequencing data is available through the Gene Expression Omnibus database. Accession number: GSE166985.

Declarations

Ethical Approval All animal procedures were reviewed and approved the local Animal Care Committee according to the Regulations for Research in Health Matters (México).

Consent for Publication All authors have reviewed and approved the manuscript for publication in this journal.

Consent to Participate Not applicable.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

- Craft S (2009) The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol* 66:300–305. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.27>
- Calvo-Ochoa E, Arias C (2015) Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 31:1–13. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2531>
- Cordner ZA, Tamashiro KLK (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 152:363–371. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.008>
- Hoscheidt SM, Starks EJ, Oh JM, Zetterberg H, Blennow K, Krause RA, Gleason CE, Pugliese L et al (2016) Insulin resistance is associated with increased levels of cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease and reduced memory function in at-risk healthy middle-aged adults. *J Alzheimer's Dis*. <https://doi.org/10.3233/JAD-160110>
- González-Reyes RE, Ahev G, Avila-Rodriguez ME, Barreto G (2016) Alterations in glucose metabolism on cognition: a possible link between diabetes and dementia. *Curr Pharm Des*. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151209152013>
- Boden G, Shulman GI (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.32.s3.3.x>
- Delarue J, Magnan C (2007) Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:142–148. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328042ba90>
- Kurotani K, Sato M, Ejima Y, Nanri A, Yi S, Pham NM, Akter S, Poudel-Tandukar K et al (2012) High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. *Nutr Res*. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.004>
- Ly LD, Xu S, Choi S-K, Ha C-M, Thoudam T, Cha S-K, Wiederkoch A, Wollheim CB et al (2017) Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med*. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.157>
- Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M (2015) Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin

- signaling molecules. *Arch Biochem Biophys*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.009>
11. Barlow J, Jensen VH, Jastroch M, Affourtit C (2016) Palmitate-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion precedes mitochondrial dysfunction in mouse pancreatic islets. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/BJ20151080>
 12. Kwon CH, Sun JL, Jeong JH, Jung TW (2020) Humanin attenuates palmitate-induced hepatic lipid accumulation and insulin resistance via AMPK-mediated suppression of the mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.128>
 13. Zeng X, Zhu M, Liu X, Chen X, Yuan Y, Li L, Liu J, Lu Y et al (2020) Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr Metab (Lond)*. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-0434-8>
 14. Breher-Esch S, Sahini N, Trincone A, Wallstab C, Borlak J (2018) Genomics of lipid-laden human hepatocyte cultures enables drug target screening for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0438-7>
 15. Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Rönn T, Nitert MD, Ling C et al (2014) Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med* 12. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-103>
 16. Grabiec K, Majewska A, Wicik Z, Milewska M, Blaszczyk M, Grzelkowska-Kowalczyk K (2016) The effect of palmitate supplementation on gene expression profile in proliferating myoblasts. *Cell Biol Toxicol* 32:185–198. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9324-2>
 17. Edmond J, Robbins RA, Bergstrom JD, Cole RA, de Vellis J (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
 18. Lovatt D, Sonnenwald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH-C, Han X, Takano T et al (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3404-07.2007>
 19. Joyal JS, Sun Y, Gantner ML, Shao Z, Evans LP, Saba N, Fredrick T, Burnim S et al (2016) Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.4059>
 20. Jo YH, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Chua S (2009) Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J Neurophysiol*. <https://doi.org/10.1152/jn.91294.2008>
 21. Calvo-Ochoa E, Sánchez-Alegria K, Gómez-Inclán C, Ferrera P (2017) Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: the role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem Int*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.09.008>
 22. Flores-León M, Pérez-Domínguez M, González-Barríos R, Arias C (2019) Palmitic acid-induced NAD⁺ depletion is associated with the reduced function of SIRT1 and increased expression of BACE1 in hippocampal neurons. *Neurochem Res* 44:1745–1754. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02810-8>
 23. Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S (2014) Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1001–1008. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.48>
 24. Bartsch T, Wulff P (2015) The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience* 309:1–16
 25. Nakandakari SCBR, Muñoz VR, Kuga GK, Gaspar RC, Sant'Ana MR, Pavan ICB, da Silva LGS, Morelli AP et al (2019) Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav Immun* 79:284–293. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.016>
 26. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 27. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
 28. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
 29. Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019) The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
 30. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
 31. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2009) edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
 32. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY (2012) ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol*. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
 33. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
 34. Wu DC, Yao J, Ho KS, Lambowitz AM, Wilke CO (2018) Limitations of alignment-free tools in total RNA-seq quantification. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4869-5>
 35. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J et al (2020) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
 36. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 27:29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
 37. Ume-gaki H (2010) Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 39:8–10. <https://doi.org/10.1093/ageing/afp211>
 38. Schrijvers EMC, Witteman JCM, Sijbrands EJJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB (2010) Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* 75:1982–1987. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ff44f6>
 39. Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, Matsui Y, Sekita A, Suzuki SO et al (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ee25f>
 40. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre A-L, Cruciani-Guglielmacci C et al (2009) Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J Clin Invest*. <https://doi.org/10.1172/JCI36714>
 41. Contreras A, Del Rio D, Martínez A, Gil C, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N et al (2017) Inhibition of hippocampal long-term potentiation by high-fat diets: is it related to an effect of palmitic

- acid involving glycogen synthase kinase-3? *NeuroReport*. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000774>
42. Mancini A, Imperlini E, Nigro E et al (2015) Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. *Molecules* 20:17339–17361. <https://doi.org/10.3390/molecules200917339>
 43. Carta G, Murru E, Lisai S, Sirigu A, Piras A, Collu M, Batetta B, Gambelli L et al (2015) Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-Acylethanolamides in rat tissues. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120424>
 44. Chen B, Huang Y, Zheng D, Ni R, Bernards MA (2018) Dietary fatty acids alter lipid profiles and induce myocardial dysfunction without causing metabolic disorders in mice. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10010106>
 45. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K (2019) The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res* 68:915–932. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>
 46. Samuels JS, Holland L, López Met et al (2018) Prostaglandin E2 and IL-23 interconnects STAT3 and RoR γ pathways to initiate Th17 CD4+ T-cell development during rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 67:589–596. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1153-8>
 47. Machacek M, Saunders H, Zhang Z, Tan EP, Li J, Li T, Villar MT, Artigues A et al (2019) Elevated O-GlcNAcylation enhances pro-inflammatory Th17 function by altering the intracellular lipid microenvironment. *J Biol Chem* 294:8973–8990. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008373>
 48. Majumder S, Amatya N, Revu S, Jawale CV, Wu D, Rittenhouse N, Meak A, Kupul S et al (2019) IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. *Nat Immunol*. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0367-4>
 49. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL (2019) The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 50:892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
 50. Nogueira G, Solon C, Carraro RS, Engel DF, Ramalho AF, Sidarta-Oliveira D, Gaspar RS, Bombassaro B et al (2020) Interleukin-17 acts in the hypothalamus reducing food intake. *Brain Behav Immun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.012>
 51. Awane M, Andres PG, Li DF, Reinecker HC (1999) NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 162:5337–5344
 52. Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wiczorek M, Wagner T, Reichardt S et al (2010) Cross talk between stimulated NF-kB and the tumor suppressor p53. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.46>
 53. An YQ, Zhang CT, Du Y, Zhang M, Tang SS, Hu M, Long Y, Sun HB et al (2016) PPAR δ agonist GW0742 ameliorates A β 1–42-induced hippocampal neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis*. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9800-7>
 54. Fann DYW, Lim YA, Cheng YL et al (2018) Evidence that NF-kB and MAPK signaling promotes NLRP3 inflammasome activation in neurons following ischemic stroke. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0394-9>
 55. Akic-da-Asai S, Ma H, Date Y (2019) Palmitic acid induces guanylin gene expression through the toll-like receptor 4/nuclear factor-kB pathway in rat macrophages. *Am J Physiol - Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00081.2019>
 56. Dong Z, Zhuang Q, Ning M, Wu S, Lu L, Wan X (2020) Palmitic acid stimulates NLRP3 inflammasome activation through TLR4-NF-kB signal pathway in hepatic stellate cells. *Ann Transl Med*. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.21>
 57. Li DX, Wang CN, Wang Y et al (2020) NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis and apoptosis in hippocampus neurons mediates depressive-like behavior in diabetic mice. *Behav Brain Res* 391:112684. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112684>
 58. Swanson KV, Deng M, Ting JPY (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19:477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
 59. Santa-Cecilia FV, Socias B, Ouidja MO et al (2016) Doxycycline suppresses microglial activation by inhibiting the p38 MAPK and NF-kB signaling pathways. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9592-2>
 60. Shrestha A, Bruckmueller H, Kildalsen H, Kaur G, Gaestel M, Wetting HL, Mikkola I, Seternes O-M (2020) Phosphorylation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) at serine 857 is regulated by the p38MAPK-MK2 axis and affects NF-kB-mediated transcription. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68219-4>
 61. Varga T, Czimmere Z, Nagy L (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1812:1007–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2011.02.014>
 62. Popeijus HE, van Otterdijk SD, van der Krieken SE et al (2014) Fatty acid chain length and saturation influences PPAR α transcriptional activation and repression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res* 58:2342–2349. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400314>
 63. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G et al (2014) RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* 63:1978–1993. <https://doi.org/10.2337/db13-1383>
 64. Sargsyan E, Cen J, Roomp K et al (2018) Identification of early biological changes in palmitate-treated isolated human islets. *BMC Genomics* 19:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5008-z>
 65. Chen Q, Xiong C, Jia K, Jin J, Li Z, Huang Y, Liu Y, Wang L et al (2019) Hepatic transcriptome analysis from HFD-fed mice defines a long noncoding RNA regulating cellular cholesterol levels. *J Lipid Res* 60:341–352. <https://doi.org/10.1194/jlr.M086215>
 66. Hegardt FG (1998) Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA synthase in the control of ketogenesis. *Biochimie* 80:803–806. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)88874-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)88874-4)
 67. Köster A, Chao YB, Mostor M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, Li D, Qiu Y et al (2005) Transgenic angiotensin-like (Angptl)4 overexpression and targeted disruption of Angptl4 and Angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0476>
 68. Tencommen T, Yu RK, Kapitonov D (2001) Characterization of the human UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase gene promoter. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1517:416–423. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00283-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00283-9)
 69. Cook ECL, Nelson JK, Sorrentino V, Koenis D, Moeton M, Scheij S, Ottenhoff R, Bleijlevens B et al (2017) Identification of the ER-resident E3 ubiquitin ligase RNF145 as a novel LXR-regulated gene. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172721>
 70. Koul O, Chou KH, Jungalwala FB (1980) UDP-galactose-ceramide galactosyltransferase in rat brain myelin subfractions during development. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/bj1860959>
 71. Schaeren-Wiemers N, Van Der Bijl P, Schwab ME (1995) The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *J Neurochem*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052267.x>
 72. Zhang L, Rajbhandari P, Priest C, Sandhu J, Wu X, Temel R, Castillo A, deAguiarVallim TQ et al (2017) Inhibition of cholesterol biosynthesis through RNF145-dependent ubiquitination of SCAP. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28766>
 73. Menzies SA, Volkmar N, van den Boomen DJH et al (2018) The sterol-responsive RNF145 E3 ubiquitin ligase mediates the degradation of HMG-CoA reductase together with gp78 and hrd1. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.40009>

74. Helen Melo AM, da Seixas da Silva GS, Ramos Sant M, Teixeira CVL, Clarke JR, Coreixas VSM, de Melo BC, Fortuna JTS, et al (2020) Palmitate is increased in the cerebrospinal fluid of humans with obesity and induces memory impairment in mice via pro-inflammatory TNF- α in brief. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.072>
75. Spinelli M, Fusco S, Mainardi M, Scala F, Natale F, Lapenta R, Mattera A, Rinaudo M, et al (2017) Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through. *Nat Commun* 8 <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02221-9>
76. de Almeida Branco Oliveira A, de Freitas Martins Melo N, Dos Santos Vieira E, Nogueira PAS, Coope A, Velloso LA, Dezaone RS, Ueira-Vieira C et al (2018) Palmitate treated-astrocyte conditioned medium contains increased glutathione and interferes in hypothalamic synaptic network in vitro. *Neurochem Int* 120:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.010>
77. Zareba-Kozioł M, Bartkowiak-Kaczmarek A, Figiel I, Krzystyniak A, Wojtowicz T, Bijata M, Włodarczyk J (2019) Stress-induced changes in the S-palmitoylation and S-nitrosylation of synaptic proteins. *Mol Cell Proteomics* 18:1916–1938. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001581>
78. Roy A, Kundu M, Jana M, Mishra RK, Yung Y, Luan C-H, Gonzalez FJ, Pahan K (2016) Identification and characterization of PPAR α ligands in the hippocampus. *Nat Chem Biol* 12:1075–1083. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2204>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

11.6.1 Anexo 7: Transcriptional Profiles Reveal Deregulation of Lipid Metabolism and Inflammatory Pathways in Neurons Exposed to Palmitic Acid. (Supplementary information)

Transcriptional profiles reveal deregulation of lipid metabolism and inflammatory pathways in neurons exposed to palmitic acid

Flores-León M¹, Alcaraz N^{2,4}, Pérez-Domínguez M¹, Torres-Arciga K³, Rebolgar-Vega R³, De la Rosa-Velázquez IA^{3,6}, Arriaga-Canon C³, Herrera LA^{3,4}, Arias C^{1*} and González-Barrios R^{3*}

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

² The Bioinformatics Centre. Department of Biology, University of Copenhagen. Ole Maaloes Vej 5 DK-2200 Copenhagen N, Denmark

³ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Avenida San Fernando No. 22, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, Mexico City, Mexico.

⁴ Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, CP 14610, Mexico City, Mexico.

⁵ Genomics laboratory, Red de Apoyo a la Investigación - CIC, Universidad Nacional Autónoma de México, INMCNSZ, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Secc. 16, Tlalpan, 14080, Mexico city, Mexico.

⁶ Present Address: Next Generation Sequencing Core Facility, Helmholtz Zentrum Muenchen, Ingolstaedter Landstr 1, 85754, Neuherberg, Germany.

*Correspondence to Rodrigo González-Barrios (rodrigop@ciencias.unam.mx) and Clorinda Arias (carias@unam.mx).

Supplementary Table 1 List of differentially expressed genes (DEG) found with each pipeline. The merged rows between pipelines depict that the genes were found by different pipelines.

Salmon + DEseq2	Salmon + edgeR	STAR + fc + edgeR	STAR + fc + DEseq2
	Rnf113a1, Mogs, LOC103693189, LOC100911186, U1, Armcx1, AABR07003537.1, LOC103689968, AABR07034273.1, Fgd1, AABR07002775.1, Miip, Entpd7, LOC102552659, Faim, Mboat7, LOC108348074, LOC108348136, Syne4, LOC100359574, LOC691254, Cass4, Ccl9, Chd9, LOC100911951, Enpp6, Impad1, Kirb1b, Abhd1, AABR07003056.1, AABR07014125.1, Snip1	Serpine1, Slc16a5, Fnrc3c1, Mir132, AABR07038886.1, Ucp2, Mir212, Acot1, AABR07003751.1, AABR07065531.19, 5S_rRNA, Rd3l, Maff, Pdk4, AABR07017825.7	Nfil3
Hells, LOC103692716, AABR07033249.1		Mki67	
Lpcat1, Npas4			
	Ccl2, AABR07054460.4, Ier3, Gprc5a, Mobp, Cxcl1, Hmgcs2, Bhlha15, Trim66, Tns3, Cyp51, Fam49a, Tgm1, Cited2, Fgf5, Insig1		
Angpt4, Ugt8, Cnp, Rnf145, Snn			

Supplementary Fig. 1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of Gene Ontology (GO) terms. The top biological processes analyzed by GO (y-axis) and the number of genes involved in each process that are altered (x-axis) are depicted in the graph. The affected lipid processes (yellow rectangles) and important biological and cellular processes for neurons (green rectangles) when they are exposed to PA are highlighted in rectangles

