

**FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCION BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A DIETA ALTA EN GRASAS Y SACAROSA
PROMUEVE EL DESARROLLO DE NEUROINFLAMACIÓN EN MODELOS
ANIMALES Y CULTIVOS PRIMARIOS**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención Biología Celular y Molecular”

PAULA MONTAÑA COLLAO

TUTOR: PABLO MUÑOZ CARVAJAL

CO-TUTOR: RAMÓN SOTOMAYOR ZARATE

2023

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de tesis a las personas que han sido fundamentales en mi camino, brindándome apoyo, inspiración y motivación constante. En primer lugar, mi más profunda dedicación va hacia mi familia. A mi hermana Denisse, quien desde el inicio de esta aventura ha estado a mi lado, ofreciéndome su apoyo emocional y financiero incondicionalmente. A mi sobrina María José, quien ha compartido conmigo cada proyecto académico y emocional desde nuestra infancia, siendo mi compañera inseparable.

No puedo dejar de agradecer a mi esposo, Francisco, por ser mi compañero en la vida y en la ciencia. Su apoyo emocional y constante motivación han sido pilares fundamentales durante todo el desarrollo del programa de magíster. Agradezco además su invaluable ayuda en los detalles esenciales para el desarrollo de esta tesis. A Victoria, quien con su inmensa alegría y carisma, ha sido una fuente de inspiración para disfrutar de cada proceso en la vida. Tu energía y positividad han iluminado mi camino y me han recordado la importancia de encontrar alegría en cada paso que doy. A mi hija Amanda, quiero dedicarte este logro. Tu paciencia inigualable durante las largas jornadas de laboratorio y tu innata curiosidad y disposición para aprender en cada circunstancia de la vida me llenan de orgullo y admiración. Eres mi mayor motivación para seguir adelante en este camino y tu presencia ha sido un regalo invaluable en mi vida.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Pablo Muñoz Carvajal, mi tutor de tesis, quien ha mostrado una gran disposición para ayudarme durante todo el proyecto. Su apoyo, recursos, conocimiento y motivación han sido fundamentales en mi crecimiento académico y profesional. Siempre ha mantenido un trato ameno y horizontal, siendo honesto y brindando su valioso apoyo. También quiero agradecer al Dr. Ramón Sotomayor Zarate, quien me acogió en su laboratorio y me brindó paciencia, conocimiento y asesoramiento constante. Su apoyo fue esencial en los primeros pasos de mi camino en la ciencia y le estoy sinceramente agradecido.

En resumen, agradezco de corazón a todas las personas que han estado a mi lado durante la realización de esta tesis, compartiendo tanto los momentos buenos como los desafiantes. Su apoyo incondicional ha sido invaluable y ha contribuido significativamente a este logro.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a las siguientes personas que hicieron posible la realización de mi tesis:

En primer lugar, al Dr. Pablo Muñoz, mi tutor de tesis, quien me enseñó con gran dedicación y profesionalismo las técnicas de inmunofluorescencia, western blot y cultivo celular, lo que me permitió adquirir habilidades y conocimientos fundamentales en mi área de investigación. También quiero agradecer al Dr. Ramon Sotomayor por el apoyo financiero brindado a través del Fondecyt Regular 120-0474, lo que me permitió realizar estudios y experimentos de alta calidad, y por compartir su vasta experiencia en técnicas como RT-qPCR, manejo de animales, espectrofotometría, electroforesis, test conductuales, campo abierto, actividad locomotora y preferencia alimentaria. Asimismo, agradezco al Dr. Jonathan Martínez por su paciencia y dedicación en mi entrenamiento en técnicas de biología molecular, resolviendo todas mis dudas y brindando su apoyo en cada paso del proceso.

De igual manera, agradezco a la Dra. Camila González por permitirme colaborar en su tesis de doctorado, lo que me permitió aprender nuevas técnicas y fortalecer mis habilidades de investigación, concretándose en mi primera publicación científica. También quisiera agradecer al Dr. Álvaro Ardiles y a la Dra. Arlek González por su apoyo en el suministro de reactivos para el desarrollo de la tesis, así como a la Dra. Paola Llanos por permitirme trabajar en su laboratorio y proporcionarme reactivos para la técnica de ELISA.

No puedo dejar de mencionar a ANID por el apoyo financiero entregado mediante la beca de magíster nacional, lo que me permitió concentrarme plenamente en mi tesis y avanzar en mi formación académica. Por último, agradezco a los revisores de mi tesis, los Dres. Lionel Muñoz, Gonzalo Jorquera y Samanta Thomas, por su valioso tiempo y comentarios, los cuales fueron fundamentales para la mejora continua de mi trabajo.

En resumen, gracias a todos ellos por su valiosa contribución, apoyo y dedicación en mi proyecto de investigación.

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad global en constante aumento, resultado del desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético. La inflamación crónica en los tejidos metabólicos es una consecuencia común de la sobre nutrición. Sin embargo, se ha investigado poco sobre si esta inflamación metabólica afecta los sistemas reguladores neurales, como el septum lateral (SL), un centro de relevancia en la transmisión de información. Este estudio exploró los efectos de una dieta obesogénica en el desarrollo de neuroinflamación, utilizando ratas y cultivos de neuronas. Se evaluó la expresión de genes inflamatorios en modelos animales mediante RT-qPCR y se analizó la translocación nuclear de NF- κ B y COX 1 en neuronas en cultivo primario. Se observaron cambios significativos en la composición corporal, la concentración de insulina en suero y en la expresión de genes inflamatorios en SL, con diferencias notables entre sexos. Estos hallazgos desafían parcialmente la hipótesis inicial, que postulaba un aumento en la expresión de genes asociados a NLRP3 como mecanismo inflamatorio central. Sin embargo, la activación del inflamosoma y los cambios en la expresión de otros genes como IL-1 β , ASC y Caspasa 1 indican la presencia de una inflamación crónica de bajo grado en el contexto de la dieta obesogénica. Además, se observaron efectos en marcadores inflamatorios tratados con ácido palmítico en células hepáticas y neuronales, respaldando la hipótesis de que la dieta obesogénica puede afectar la función cerebral. Estos resultados destacan la complejidad de los mecanismos inflamatorios relacionados con la obesidad y subrayan la necesidad de seguir investigando para comprender completamente las interacciones entre dieta, inflamación y cerebro.

PALABRAS CLAVES: Obesidad, Inflamación, SNC, Palmitato, HFD, Sacarosa.

SUMMARY

Obesity is a globally increasing disease resulting from an imbalance between food intake and energy expenditure. Chronic inflammation in metabolic tissues is a common consequence of overnutrition. However, little research has been conducted on whether this metabolic inflammation affects neural regulatory systems, such as the lateral septum (LS), a center of information relay. This study investigated the effects of an obesogenic diet on the development of neuroinflammation using rats and neuronal cultures. The expression of inflammatory genes in animal models was evaluated using RT-qPCR, and nuclear translocation of NF- κ B and COX1 was analyzed in primary cultured neurons. Significant changes were observed in body composition, serum insulin concentration, and the expression of inflammatory genes in the LS, with notable differences between sexes. These findings partially challenge the initial hypothesis, which postulated an increase in the expression of genes associated with NLRP3 as a central inflammatory mechanism. However, the activation of the inflammasome and changes in the expression of other genes such as IL-1 β , ASC, and Caspase 1 indicate the presence of chronic low-grade inflammation in the context of the obesogenic diet. Additionally, effects on inflammatory markers treated with palmitic acid were observed in hepatic and neuronal cells, supporting the hypothesis that the obesogenic diet can affect brain function. These results highlight the complexity of obesity-related inflammatory mechanisms and emphasize the need for further research to fully understand the interactions between diet, inflammation, and the brain.

Keywords: Obesity, Inflammation, CNS, Palmitate, HFD, Sucrose

ACRÓNIMOS

HFD	:	Dieta alta en grasas
SAC	:	Sacarosa
ADN	:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	:	Ácido Ribonucleico
BSA	:	Bovine Serum Albumin
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
NF- κ B	:	Factor nuclear-kappa B
SNC	:	Sistema Nervioso Central
UV	:	Ultravioleta
CICUAL	:	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
PFA	:	Paraformaldehído

CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
ACRÓNIMOS	VI
CONTENIDO	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
2.2 HIPÓTESIS	17
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	19
4.1 MUESTRA IN VIVO	19
4.2 Eutanasia Animales	19
4.3 Obtención de Septum lateral	20
4.4 TÉCNICA DE RT-QPCR	20
4.4.1 Extracción de ARN	20
4.4.2 RT- PCR cuantitativa	20
4.4.3 Análisis de datos de RT-qPCR.	21
4.5 ELISA	21
4.6 MODELO IN VITRO	21
4.6.1 Cultivo celular primario	21
4.6.2 Cultivo línea celular HepG2	22
4.6.7 Diseño Experimental modelo in vitro	22
4.6.8 Preparación de palmitato	22
4.6.9 Tratamiento con palmitato	23
4.7 INMUNOFLUORESCENCIA CULTIVO CELULAR	23

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	26
5.1 ESTUDIOS IN VIVO	26
5.2 ESTUDIOS IN VITRO	32
CAPITULO 6. DISCUSIÓN	36
LIMITACIONES/PROYECCIONES FUTURAS:	40
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	41
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	42

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

A1. Obesidad

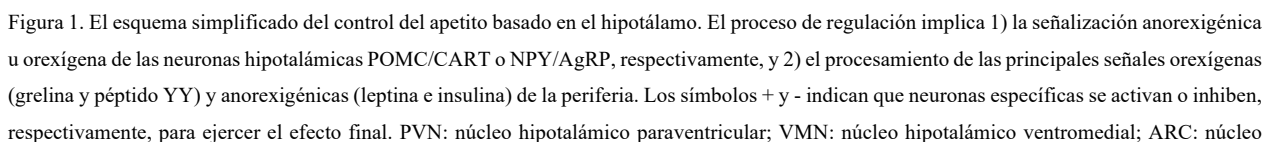
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal y excesiva de grasa que representa un riesgo para la salud ¹. Para ser más específicos la obesidad es una enfermedad multifactorial que resulta de un balance energético el que es positivo y sostenido en el tiempo, en otras palabras, cuando la ingesta de energía alimentaria supera el gasto energético, ocasionando un aumento del peso corporal asociado a una acumulación de grasa excesiva ². En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) describió que a nivel mundial más de 1.900 millones de adultos (> 18 años) tenían sobrepeso y 650 millones de ellos eran obesos. Además, 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) tenían sobrepeso u obesidad, lo que representa un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad del 4% en 1975 a más del 18% en 2016. En Chile, según La Encuesta Nacional de Salud (2016 - 2017) el 74,2% de la población mayor de 15 años presenta algún grado de exceso de peso y el 34,4% de esta población tiene obesidad. Según el mapa JUNAEB 2022 el 58,3% de los niños, niñas y adolescentes, presenta mal nutrición por exceso ³. La globalización de los sistemas alimentarios, con la producción masiva de alimentos altamente procesados y su disponibilidad a precios asequibles, se ha identificado como uno de los principales factores impulsores de la epidemia de la obesidad. Esta tendencia fomenta el consumo excesivo e indiscriminado de alimentos y bebidas ricas en energía pero con escaso valor nutricional ⁴. En los países desarrollados, la disponibilidad de alimentos con alto contenido de azúcar, grasa y calorías ha dado lugar a una transformación en el entorno alimentario moderno, creando un ambiente de abundancia en el que estos alimentos ofrecen un considerable valor hedónico ⁵. El valor hedónico de los alimentos se refiere a la satisfacción o placer experimentado al consumir ciertos alimentos. Este valor está basado en la percepción subjetiva que cada individuo tiene respecto a los sabores, aromas, texturas y apariencia de los alimentos. Algunos alimentos, como los dulces, chocolates, helados, pizzas y hamburguesas, poseen un alto valor hedónico debido a que se consideran sabrosos y agradables al paladar ⁶.

A.2 Consecuencias de la obesidad

La obesidad está directamente relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares y metabólicas, que implican riesgo para la salud y un deterioro en la calidad de vida ⁷, la resistencia a la insulina (RI) contribuye al aumento de la producción de glucosa en el hígado y a la disminución de la captación de glucosa en el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Estos procesos ocurren tempranamente en la patogenia de la diabetes tipo 2 (DM2) y contribuyen al desarrollo de la enfermedad ⁸. Antes del inicio de esta enfermedad, se observa una hiperinsulinemia compensatoria, que disminuye como resultado de una disfunción progresiva de las células β pancreáticas que con el transcurso del tiempo conduce al deterioro de la homeóstasis de la glucosa y, finalmente, a la diabetes. De esta manera, el desarrollo de DM2 generalmente se debe a una combinación de RI y disfunción de las células β . Con el transcurso del tiempo, la DM2, conduce a una serie de complicaciones a largo plazo, que incluyen patologías microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía), enfermedades macrovasculares (accidentes cerebrovasculares, infarto al miocardio y enfermedad arterial periférica), insuficiencia cardíaca y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Junto con esto, en los últimos años se ha vinculado la DM2 con la progresión de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de ovario poliquístico, artritis reumatoide y gota, entre otras enfermedades que son promovidas por la inflamación ⁹⁻¹¹.

En este sentido, la inflamación tisular crónica se ha convertido en una característica clave de la obesidad y se observa en los tejidos metabólicos que son diana de la insulina, como el tejido adiposo, el hígado, los músculos y los islotes pancreáticos. En estos tejidos, se producen complejas interacciones entre procesos inmunológicos y defectos metabólicos. Un componente fundamental de esta inflamación crónica de bajo grado es el reclutamiento, la acumulación y la activación de macrófagos proinflamatorios. Es en estos tejidos metabólicos, donde la insulina tiene un impacto especialmente significativo. Estos macrófagos proinflamatorios desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la perpetuación de la inflamación, contribuyendo así a la fisiopatología de la obesidad y la RI ¹².

La ingesta de alimentos está regulada a través de áreas cerebrales relacionadas con la homeostasis (hipotálamo) y el placer (sistema de la recompensa). La regulación homeostática de la alimentación es controlada por la acción de hormonas periféricas como insulina, leptina y ghrelina, entre otras, que inhiben o activan a neuronas hipotalámicas ¹³ (Figura 1). Por ejemplo, leptina e insulina activan a neuronas anorexigénicas productoras de los péptidos proopiomelanocortina (POMC) y transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART) que al liberar el péptido hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) estimulan a neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), las cuales a través de aferencias hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) disminuyen la ingesta de comida y aumentan el gasto energético. Además, la leptina activa a neuronas glutamatérgicas del hipotálamo ventromedial (VMH), también conocido como el centro de la saciedad, que a través de la liberación de glutamato activan a las neuronas POMC/CART. Por otro lado, la hormona Ghrelina producida por el estómago es liberada durante periodos de ayuno prolongados, estimulando a neuronas AgRP/NPY del núcleo arcuato (ARC), las cuales inhiben a las neuronas del PVH. Además, Ghrelina estimula a neuronas AgRP/NPY que proyectan axones directamente a las neuronas del hipotálamo lateral (LH), conocido como centro del hambre, aumentando la ingesta de alimentos y disminuyendo el gasto energético.



hipotalámico arqueado; SON: núcleo hipotalámico supraóptico; POMC/CART: las neuronas anorexigénicas pro-opiomelanocortina (POMC)/transcriptas reguladas por cocaína y anfetamina (CART); NPY/AgRP: neuronas de neuropéptido Y orexigénico (NPY)/péptido relacionado con agutí (AgRP); BO: bulbo olfatorio; Cerebro: cerebelo. Imagen obtenida de ¹⁴.

A4. Control hedónico de la alimentación

El termino de alimentación hedónica se refiere a la ingesta impulsada no por la necesidad metabólica sino por la recompensa experimentada al consumir el alimento ¹⁵. En el Sistema Nervioso Central (SNC), hay varias áreas del cerebro involucradas en el control fisiológico de la alimentación y su desregulación podría jugar un papel importante en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad. Algunas de estas áreas son el hipotálamo, específicamente hipotálamo lateral (HL), en donde se encuentran neuronas del tipo orexígenas (asociado con el control homeostático de la alimentación) y el circuito de recompensa (asociado con el control hedónico de la alimentación). El circuito de recompensa o circuito mesolímbico está formado por neuronas de dopamina del mesencéfalo que proyectan sus axones desde el área tegmental ventral (VTA) hacia áreas límbicas como el núcleo accumbens (NAcc) y hacia áreas corticales como la corteza prefrontal ^{16,17}. Estas neuronas dopaminérgicas son inhibidas tónicamente por las interneuronas GABA del área tegmental ventral (VTA) ^{18,19}. Por lo que las drogas de abuso como la cocaína, la anfetamina, etanol, nicotina y la morfina, entre otras, aumentan la liberación de dopamina en núcleo accumbens ^{20,21}. Las recompensas naturales, como los alimentos ricos en grasas, sacarosa y sodio, el agua, el sexo y la crianza, tienen la capacidad de activar el circuito mesocorticolímbico, generando sensaciones placenteras al comer, beber, reproducirse y alimentarse ^{22,23}. Estas sensaciones placenteras están asociadas con la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NAcc) y la corteza prefrontal. Se ha sugerido que la acumulación de lípidos, como acil-CoA, palmitoil y estearoil-CoA, en el hipotálamo puede llevar a disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en las células hipotalámicas. A su vez, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo pueden activar las vías inflamatorias en el hipotálamo, desencadenando una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado ^{24,25}.

Si bien la resistencia a la insulina puede preceder y contribuir a la inflamación en el tejido adiposo, la mayoría de los estudios respaldan que la inflamación juega un papel causal en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Es decir, la inflamación ocurre primero y luego se desarrolla la resistencia a la insulina. Una vez que se inicia, la inflamación y la resistencia a la insulina pueden

amplificarse mutuamente. Esta inflamación crónica de bajo grado en el hipotálamo se asocia con la resistencia a la insulina y promueve la acumulación de lípidos ²⁶. Además, las neuronas hipotalámicas orexigénicas, que son responsables de regular la ingesta de alimentos, están bajo el control de las neuronas inhibitoras de la porción lateral del septum ¹. Se cree que este control puede afectar el aspecto hedónico del consumo de alimentos. Ya que, los cambios en la actividad de los circuitos neuronales del hipotálamo, causados por la microinflamación hipotalámica, pueden contribuir a la obesidad y el síndrome metabólico. La microinflamación hipotalámica, junto con los cambios en la actividad de los circuitos neuronales del hipotálamo, como resultado de la acumulación de lípidos, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, la activación de vías inflamatorias y la resistencia a la insulina, desempeñan un papel importante en la obesidad y el síndrome metabólico. Estos cambios influyen en el control del apetito, el metabolismo energético y la regulación de la glucosa en sangre, contribuyendo al desarrollo de estas condiciones ^{28,29}. Por lo tanto, es interesante investigar las implicancias neuroinflamatorias en los núcleos de este circuito en el contexto de la obesidad.

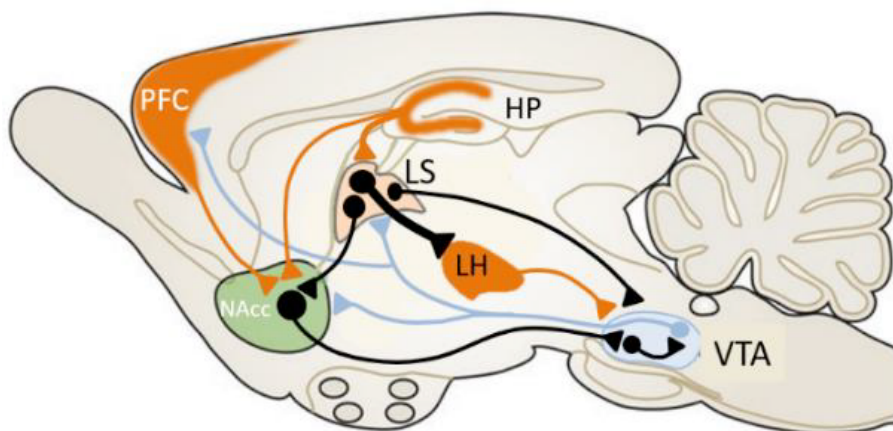


Imagen diseñada por el Dr. Christian Bonansco.

Figura 2. Conexiones entre septum lateral (SL), hipocampo (HP), hipotálamo lateral (HL) y área tegmental ventral (VTA). HP envía proyecciones glutamatérgicas las cuales excitan a las neuronas del LS, las que a su vez inhiben al HL mediante neurotransmisión GABAérgicas, generando saciedad. Nótese que SL recibe proyecciones dopaminérgicas del VTA, por lo que también está implicado en el comportamiento adictivo. Abreviaturas: corteza prefrontal, PFC; núcleo accumbens, NAcc.

A5. Obesidad e inflamación

A.5.1 La inflamación asociada a la obesidad y su vínculo con la insulino-resistencia

La contribución potencial de la inflamación tisular crónica a la enfermedad metabólica se ha sugerido hace algunos años ^{12,30,31}. Hay un vínculo reportado por Feingold et al. hace algunas décadas, descubrió que el factor de necrosis tumoral (TNF- α) conduce a la intolerancia a la glucosa en roedores ³². La observación de que el tejido adiposo en la obesidad expresa altos niveles de TNF- α y que su neutralización mejora la sensibilidad a la insulina y la intolerancia a la glucosa fueron hallazgos clave para establecer la asociación entre las células inmunitarias y la disfunción metabólica ^{33,34}. Las citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , tienen la capacidad de activar diversas moléculas de señalización intracelular, como JNK (c-Jun N-terminal kinase) e IKKB (I kappa B kinase beta). Estas moléculas celulares desempeñan un papel fundamental en la regulación de la señalización celular y la respuesta inflamatoria, lo que puede resultar en una disfunción de la acción de la insulina ^{35,36}. La activación de IKKB conduce a la translocación nuclear del factor nuclear (NF- κ B), que impulsa una mayor expresión de mediadores inflamatorios, incluidas quimioquinas y las citoquinas ^{37,38,39}. Existen otros mecanismos subyacentes que vinculan la obesidad y la inflamación, y uno de ellos es la acción de las células macrófagos del tejido adiposo (MTA), las cuales producen factores que pueden interrumpir la señalización de la insulina en las células diana a través de mecanismos paracrinós o sistémicos. Se ha prestado considerable atención a las quimioquinas y citoquinas producidas por los macrófagos con fenotipo inflamatorio similar a M1, debido a su asociación con la disminución de la sensibilidad a la insulina. Entre estas moléculas, el TNF- α ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de reducir la sensibilidad a la insulina ¹¹. El TNF- α promueve la fosforilación inhibitoria de las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS), aumenta la síntesis de ceramida y la lipólisis en los adipocitos, e inhibe la expresión de PPAR γ ^{9,40}. Los niveles adecuados de PPAR γ son necesarios para mantener la sensibilidad a la insulina.

A.5.2 La inflamación del tejido adiposo

Tanto en ratones como en humanos, la obesidad produce un mayor número de MTA ⁴¹, contribuyendo al estado de resistencia a la insulina ⁴¹. De hecho, la prevención de la acumulación de MTA o la señalización de macrófagos proinflamatorios protege a los ratones obesos de la intolerancia a la glucosa y la RI ⁴². Si bien existen otros tipos de células inmunitarias que participan en la inflamación del tejido adiposo durante la obesidad, como algunas células T y B, se cree que los macrófagos son las principales células efectoras en la disminución de la señalización de insulina ⁴³. Tanto en ratones como humanos normo-peso, los MTAs contribuyen del 10% al 15% de las células estromo-vasculares y muestran un estado de polarización similar a M2 ⁴¹. En condiciones de obesidad, el número de MTA aumenta y puede llegar hasta el 40% de todas las células del tejido adiposo ⁴⁴. La mayoría de los MTA inducidos por la obesidad son proinflamatorios (similares a M1) y hallazgos similares se han mostrado en MTA humanos ⁴⁵.

A.5.3 Iniciación de la inflamación crónica

Se han propuesto varios mecanismos iniciadores de la inflamación tisular crónica en el contexto de la obesidad, y estos mecanismos no son excluyentes entre sí y podrían funcionar de manera complementaria. Uno de los desencadenantes finales de la inflamación es la proliferación de MTA o la quimiotaxis de monocitos hacia los tejidos inflamados. La obesidad se caracteriza por un aumento en el consumo de nutrientes, y este aumento puede desempeñar un papel en la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). En una dieta alta en grasas y azúcares, los micronutrientes esenciales como vitaminas y minerales pueden estar en déficit. Estas moléculas son componentes clave de los sistemas antioxidantes endógenos del organismo, que ayudan a mantener el equilibrio y neutralizar el exceso de ROS ⁴⁶. Una ingesta inadecuada de estos nutrientes, el sistema antioxidante puede debilitarse, lo que lleva a un aumento del estrés oxidativo. El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del organismo para desintoxicar o neutralizar sus efectos deletéreos. El exceso de ROS puede dañar las células y los tejidos, desencadenando respuestas inflamatorias. En el contexto de la obesidad, el tejido adiposo acumula grasa en exceso, lo que puede aumentar la producción de ROS a través de diversos procesos metabólicos ⁴⁷. Además del estrés oxidativo, la sobrecarga de nutrientes en la obesidad también puede inducir estrés en el retículo endoplasmático

(RE) de las células. El RE es un orgánulo celular que desempeña un papel crucial en la síntesis de proteínas y el plegamiento de proteínas correctamente. Cuando se produce una sobrecarga de nutrientes, como glucosa y ácidos grasos libres, se pueden acumular proteínas mal plegadas en el RE, desencadenando una respuesta conocida como estrés del retículo endoplasmático ⁴⁸. El estrés del retículo endoplasmático activa vías inflamatorias intracelulares, como la vía del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez puede promover la producción y liberación de moléculas inflamatorias. Además, los ácidos grasos, como el palmitato, y otros componentes de la dieta pueden activar los inflammasomas y los receptores tipo Toll (TLR), específicamente el TLR-4, lo que lleva a la estimulación de vías inflamatorias aguas abajo ⁴⁹.

A.5.4 Inflamación hepática

La obesidad conduce característicamente a la esteatosis hepática y la inflamación del hígado, comúnmente denominada enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) que es una condición en la cual se acumulan lípidos en los hepatocitos ⁵⁰. La acumulación de lípidos en los hepatocitos es multifactorial. En la obesidad, los adipocitos se vuelven resistentes a la insulina, lo que conduce a una supresión alterada de la lipólisis con una mayor liberación de ácidos grasos libres. Esta mayor afluencia de ácidos grasos libres derivados de los adipocitos, así como la grasa de la dieta que ingresa al hígado a través de los quilomicrones derivados del tracto intestinal, son importantes mecanismos proesteatóticos ^{51,52}. Además, dentro del hepatocito, las vías de lipogénesis de novo, que es la síntesis de ácidos grasos a partir de hidratos de carbono, la cual se ve aumentada en la obesidad y esto se combina con una disminución de la oxidación de ácidos grasos ⁵¹. Todos estos factores impulsan la esteatosis y la NAFLD.

Hay dos categorías principales de macrófagos hepáticos: Células de Kupffer (KC) y macrófagos hepáticos reclutados (RHM) ⁵³. Los RHM son macrófagos hepáticos se derivan de la médula ósea y surgen de los monocitos circulantes que ingresan al hígado en respuesta a las quimioquinas, principalmente CCL2/MCP-1, que pueden secretarse a partir de hepatocitos esteatóticos y KC ⁵⁴. Estos monocitos se diferencian en RHM proinflamatorios similares a M1 ⁵⁵. En la obesidad, los números de KC permanecen relativamente sin cambios, pero hay un gran aumento en los RHM ⁵⁴. Los RHM también producen quimiocinas, lo que establece un circuito de retroalimentación positiva, en el que los RHM recién llegados producen quimiocinas, que atraen monocitos

adicionales al hígado ⁵⁵. Las KC realizan funciones depuradoras y fagocíticas, como eliminar glóbulos rojos senescentes para garantizar la conservación del hierro, filtrar factores derivados del intestino como LPS y participar en la homeostasis y reparación de tejidos ⁵⁶. En la obesidad, los RHM son predominantemente proinflamatorios y son responsables del componente principal de la inflamación hepática mediada por la obesidad ⁵⁵. Las células de Kupffer (KC) y los hepatocitos residentes (RHM) desempeñan un papel importante en la señalización intrahepática. Las citoquinas liberadas por los macrófagos hepáticos pueden estimular la lipogénesis de novo en los hepatocitos y la biosíntesis de ceramida, lo que contribuye a la acumulación de grasa en el hígado ⁵⁷. Es importante destacar que los macrófagos no son las únicas células inmunitarias involucradas en la inflamación hepática asociada a la obesidad. La obesidad también puede llevar a un aumento de los neutrófilos hepáticos y de las células T CD8⁺ ⁴⁵. Se ha sugerido que los macrófagos polarizados hacia el fenotipo M2 pueden presentar antígenos que contienen isolevuglandina a las células T CD8⁺ en el tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) ⁵⁸. Esto podría resultar en la expansión selectiva de clonotipos de células T CD8⁺ específicos del receptor de células T (TCR) que se unen a esos antígenos. En consecuencia, los antígenos asociados con la obesidad podrían influir en la selección y modificación del repertorio de TCR en los depósitos adiposos, lo que podría alterar las respuestas inmunitarias en dichos tejidos. Además, se ha observado que la elastasa de neutrófilos puede ser liberada y absorbida por los hepatocitos, lo que promueve la degradación intracelular del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS-2) y, por lo tanto, aumenta la resistencia a la insulina en los hepatocitos. La progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) también depende parcialmente de la actividad de los macrófagos hepáticos proinflamatorios que producen TNF- α ^{59,60}.

A.5.5 La neuroinflamación en el SNC

Durante los últimos años, se ha investigado activamente en la búsqueda de un mecanismo subyacente común en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la obesidad. Estos estudios han revelado una estrecha relación entre el exceso de nutrientes y las alteraciones en los mediadores celulares y moleculares de la inmunidad y la inflamación ⁶¹. Se ha demostrado que una HFD puede desencadenar la activación de células no neuronales, como astrocitos y microglía, lo que resulta en reacciones neuroinflamatorias que interrumpen su función normal ⁶²⁻⁶⁵. En ratas expuestas a una

HFD durante 16 semanas, se observó que el hipotálamo lateral modulaba la expresión de ARNm que codifica proteínas relacionadas con el control de la alimentación y el sistema inmunológico. Además, se observó un aumento significativo en la expresión de las citoquinas TNF- α e IL-6, lo que sugiere la activación de una señalización proinflamatoria ⁶⁶. La DIO también se ha asociado con una forma atípica de activación de señales proinflamatorias en el hipotálamo, conocida como señalización proinflamatoria de bajo grado ⁶⁷. Se reconoce que una HFD actúa como una señal de peligro endógena reconocida por los patrones moleculares asociado a daño (DAMP) ⁶⁸, activando el ensamblaje de NLRP3 (proteína 3 relacionada con NOD-like receptor con dominio de piroptosis), un sensor inmune innato, que es una proteína inflamatoria de la familia de los receptores tipo NOD-like (NLR), que induce el reclutamiento y activación autocatalítica de la cisteína proteasa caspasa-1, una cisteína proteasa que está bajo la acción de la proteína adaptadora ASC, lo que resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 ⁶⁹. Estas citoquinas se han relacionado causalmente con el desarrollo de patologías metabólicas, incluyendo la RI, la disfunción de las células beta pancreáticas, NAFLD y la aterosclerosis ⁷⁰. Además, se ha observado que la vía de señalización IKK β /NF- κ B, que es un regulador central de la inmunidad innata, se activa de manera atípica en condiciones de sobrealimentación. La activación de esta vía está relacionada con el desequilibrio energético subyacente a la obesidad y responde a las señales metabólicas producidas por la sobrenutrición. Esta vía también está relacionada con múltiples enfermedades neuronales ^{71,67}. Los macrófagos, como células inmunitarias importantes, desempeñan un papel clave en la inflamación crónica de bajo grado. Detectan y responden a diversas tensiones en los órganos metabólicos, incluido el tejido adiposo, el hígado y la pared arterial⁷². La actividad de los macrófagos está asociada con la activación de NF- κ B a través del receptor TNF- α y las quinasas IKK. La actividad de NF- κ B está bajo el control de señales extracelulares y la fosforilación de las moléculas I κ B promueve su degradación, lo que libera NF- κ B y permite su translocación al núcleo para regular la transcripción de genes diana ⁷³. Estos genes están involucrados en la diferenciación de diferentes tipos de células inmunitarias y están relacionados con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas ^{74,67}. Aunque aún no se comprende completamente el vínculo mecanicista entre estas redes de genes asociados a la inflamación, la obesidad inducida por la sobrealimentación y el sedentarismo, se ha hipotetizado que las áreas cerebrales relacionadas con la recompensa pueden estar hiperestimuladas por alimentos ricos en grasas y carbohidratos, lo que podría favorecer la dependencia o adicción a la

comida ²⁹. Sin embargo, se desconocen los procesos inflamatorios en núcleos cerebrales específicos, como el septum lateral, que se considera un centro de relevancia en la información cerebral.

A.5.6 Inflamación inducida por palmitato

Existe evidencia que sugiere que el ácido palmítico (PA) puede desempeñar un papel en la obesidad y puede tener efectos negativos en las neuronas del hipocampo de ratón ⁷⁵. El PA es un ácido graso saturado que se encuentra comúnmente en alimentos como los productos lácteos, cárnicos, alimentos ultra procesados y el aceite de palma ⁷⁶. Se ha sugerido que los altos niveles de PA en la dieta contribuyen al desarrollo de la obesidad, así como a otros problemas de salud como la mencionada RI y ECV. Es importante mencionar que el PA es el ácido graso saturado (SFA) más abundante presente en la circulación y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) ⁷⁷. Es cierto que el papel nutricional del PA en la dieta es objeto de debate y controversia. Aunque se ha asociado con el aumento de factores de riesgo como el colesterol LDL, marcadores inflamatorios y RI cuando se consume en exceso, también desempeña funciones importantes en el organismo. El PA es el principal ácido graso presente en la leche humana y se produce endógenamente en el cuerpo. La producción endógena de PA garantiza su concentración constante en los fosfolípidos de las membranas celulares y también participa en la formación de ácido oleico a través de reacciones enzimáticas. El ácido oleico, a su vez, puede generar otras moléculas con actividad biológica, como la palmitoiletanolamida (PEA) y las N-aciletanolaminas (NAE) como la oleoiletanolamida (OEA). Estas moléculas están implicadas en funciones antiinflamatorias, analgésicas y reguladoras de diversas proteínas ⁷⁶. Sin embargo, se ha demostrado que altas concentraciones de ácidos grasos libres, como el PA, pueden tener efectos dañinos en las células neuronales, pero se requieren concentraciones de alrededor de 100 μM para observar estos efectos nocivos ⁷⁸. En términos de la dieta, aún no se ha establecido un umbral específico a partir del cual el PA comienza a tener efectos inflamatorios. La acumulación excesiva de PA en los tejidos puede estar relacionada con su metabolismo inadecuado o la incapacidad del organismo para procesarlo eficientemente. Es importante destacar que los ácidos grasos, incluido el PA, pueden atravesar la barrera hematoencefálica y afectar la función del sistema nervioso central. Se ha observado que los ácidos grasos libres, como el PA y el ácido láurico, pueden desencadenar la inflamación en macrófagos y

afectar el procesamiento de amiloide en neuronas y astrocitos ⁶⁴. Se ha informado que existe un aumento de la captación cerebral y la acumulación de palmitato en pacientes con obesidad y síndrome metabólico ⁷⁹. En ratones, se ha demostrado que los SFA, incluido el PA, afectan el hipotálamo, regulador de la homeostasis metabólica periférica ⁸⁰⁻⁸². El PA se ha relacionado con la resistencia a la insulina, el estrés del retículo endoplasmático y una mayor respuesta proinflamatoria en el hipotálamo de ratones ⁸³⁻⁸⁵. Sin embargo, aún no se comprende completamente si el PA se acumula en el sistema nervioso central (SNC) de individuos obesos o con sobrepeso y si interfiere con los mecanismos de plasticidad sináptica y memoria. No obstante, estudios basados en resonancia magnética han sugerido que las personas con obesidad y diabetes tipo 2 (DM2) podrían presentar alteraciones estructurales que incluyen un volumen cerebral reducido, así como atrofas en las regiones hipocampales y corticales ^{86-88,89,90}. Además, se ha demostrado que el PA, presente en los tejidos periféricos, desencadena cascadas de señalización de estrés inflamatorio y metabólico, interrumpiendo la señalización de la insulina ^{34,91}. El PA induce resistencia a la insulina en el hipotálamo ⁹², el hígado ⁹³ y el músculo ⁹⁴. Se ha observado que la presencia de niveles elevados de PA y la liberación de interleucinas en la circulación periférica están asociadas con la inflamación cerebral y la disfunción en la señalización de la insulina en individuos con malnutrición por exceso y enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, dislipidemia e hipertensión arterial. Estos mecanismos contribuyen a una disminución del rendimiento cognitivo ⁷⁵. El PA tiene un impacto en las células microgliales, que secretan factores inflamatorios, incluyendo TNF- α , que alteran la memoria y el funcionamiento cerebral. En base a los antecedentes presentados nos preguntamos sobre como seria el efecto del consumo de una dieta alta en grasas y sacarosa, así como del uso de PA en el cultivo de células y modelo animal, en la vía que induce inflamación crónica.

CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una relación entre una dieta rica en grasas y sacarosa y la promoción de la neuroinflamación en un modelo animal, así como en un cultivo neuronal hipocampal primario expuesto a medios condicionados de células de hepatocitos tratadas con 100 μ M de palmitato?

2.2 HIPÓTESIS

Se plantea que una dieta alta en grasas y sacarosa al 5% aumentará la expresión de genes asociados a la inflamación en el septum lateral en un modelo *in vivo* de obesidad, mientras que el ácido palmítico activará la translocación de NF κ B y aumentará a Cox1, lo que resultará en una neuroinflamación crónica de bajo grado en el hipocampo en un modelo *in vitro*.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la neuroinflamación inducida *in vivo*, por una dieta obesogénica, en el cerebro de ratas e *in vitro*, por medios condicionados de células hepáticas tratadas con ácidos grasos saturados, sobre cultivos de neuronas hipocámpales de ratón.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de genes de IL-1 β , ASC, Caspasa 1 y NLRP3 relacionados con la inflamación en la vía septal en modelos animales alimentados con dieta obesogénica mediante la técnica de RT-qPCR.
2. Caracterizar los cambios morfológicos en células hepáticas y neuronas de cultivo primario de ratón inducidos por el uso de medio condicionado de células hepáticas estimuladas con palmitato mediante la técnica de inmunofluorescencia.
3. Analizar la translocación del factor de transcripción NF κ B y marcador de neuroinflamación COX1 utilizando la técnica de inmunofluorescencia.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1 MUESTRA IN VIVO

Animales

Se utilizaron 24 ratas Sprague-Dawley (12 machos y 12 hembras) adultas. Peso entre 350 y 400 g. Mantenido bajo condiciones estándar de temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo luz-oscuridad de 12h. Comida y agua ad libitum. Desde el PND 21, fueron destetadas, y se agruparon hasta el día 62 por sexo y condición de alimentaria experimental, es decir, animales expuestos a dieta alta en grasa (HFD; Rodent Diet60 % kcal Fat, Formula Code D12492, ResearchDiets, Inc.) más sacarosa al 5% o dieta control (Chow; Rat Diet, Formula Code 5012, LabDiet®) más agua (Figura 3). Se realizó toma de datos antropométricos como el peso durante los días hábiles para establecer curvas de crecimiento. Se registró la etapa del ciclo estral en las ratas hembra. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité para el Cuidado de Animales de Laboratorio de la facultad de ciencias (CICUAL-Ciencias) “ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA” y de Bioseguridad “CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD” de la Universidad de Valparaíso, código 27/2021.



Figura 3. Diseño experimental modelo de exposición crónica a HFD + 5% sacarosa. Cronológicamente, las ratas son separadas según sexo y dieta en el PND21. Desde el destete los grupos son alimentados con dieta Chow o HFD+SAC 5% hasta el PND62. Luego las ratas son profundamente anestesiadas y eutanasiadas para llevar a cabo los experimentos de qRT-PCR y ELISA.

4.2 Eutanasia Animales

En PND62, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (5% en flujo de aire de 0,6 L/min) en una cámara de inducción utilizando un sistema de anestesia animal (modelo 510, RWD Life Science Co. Ltd., Shenzhen, China). Una vez que el animal se sedó, se midieron los reflejos en sus extremidades y posteriormente se sacrificó. El corte se efectuó en la región cervical con el uso de instrumental adecuado (guillotina para ratas) permitiendo disponer de la región cefálica de manera más rápida, donde luego se traspasó a una placa de Petri plástica con papel absorbente en su interior.

El resto del cuerpo del animal se utilizó para extraer tejidos de interés como grasa retroperitoneal, grasa gonadal, grasa parda y musculo tibial.

4.3 Obtención de Septum lateral

Se realizó un corte sagital en el cuero cabelludo del animal con una hoja doble filo (tipo Gillette). Con ayuda de una tijera quirúrgica se abrió el cráneo y con pinzas quirúrgicas se abrieron las meninges y se dejó expuesta la masa encefálica. Con una espátula curva se extrajo el cerebro del animal y se colocó encima de una placa petri con papel filtro, agregando solución de suero salino, para así limpiar el exceso de sangre. Éste se disecciono y se traspasó a tubos eppendorf los núcleos de interés. Luego se almaceno a -80°C para la realización de la técnica de RT-qPCR.

4.4 TÉCNICA DE RT-QPCR

4.4.1 Extracción de ARN

El ARN se aisló usando E.Z.N.A Kit de ARN de tejido (Cat. R6688-01, Omega Bio-tek, Georgia, EE. UU.) según lo especificado por el fabricante. La cuantificación del ARN total se realizó utilizando un espectrofotómetro de microvolumen (EPOCH, Biotek Instrument, Inc, EE.UU.). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 5%. El ADNc se sintetizó a partir de una concentración de 50 ng de ARN usando el kit de transcripción a la inversa de ADNc de alta capacidad (REVERT AID, Cat. K1691, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EE.UU.) con cebadores aleatorios.

4.4.2 RT- PCR cuantitativa

Se realizó utilizando estándar (Cat. #600828, mezcla maestra Brilliant II SYBR® Green QPCR Green). Las muestras se analizaron por triplicado y la expresión se normalizó con el gen constitutivo 18S.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Caspasa 1	CAC GAG ACC TGT GCG ATC AT	CTT GAG GGA ACC ACT CGG TC
IL-1 β	AGC TTC AGG AAG GCA GTG TC	TCA GAC AGC ACG AGG CAT TT
NLRP3	CTC TGC ATG CCG TAT CTG GT	GTC CTG AGC CAT GGA AGC AA
ASC	TGC TGC AGA TGG ACC CCA TA	CAC AGC TCC AGA CTC TTC CAT A
18s	TCA AGA ACG AAA GTC GCA GG	GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA

Tabla 1. Secuencias de los cebadores forward y reverse para los genes de caspasa 1, IL-1 β , NLRP3, ASC y el gen control 18s.

4.4.3 Análisis de datos de RT-qPCR.

Los datos que se obtuvieron por el ensayo fueron expresados como FOLD CHANGE del gen en estudio en animales alimentados con dieta alta en grasas y sacarosa al 5% respecto a animales alimentados con dieta control, se normalizaron los resultados utilizando el gen constitutivo 18S y se determinó por la siguiente fórmula.

$FOLD = 2^{-\Delta(\Delta CT)}$ Donde $\Delta CT = Ct \text{ gen muestra} - ct \text{ gen control (18s)}$

$\Delta(\Delta CT) = \Delta CT \text{ Animales alimentados con HFD} - \Delta CT \text{ Control (Animales alimentados con dieta control)}$

4.5 ELISA

La insulina e IL-1 β en plasma se midieron con un kit ELISA de insulina de rata/ratón (Merck, Darmstadt, Alemania) y un kit ELISA de IL-1 β de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.6 MODELO IN VITRO

4.6.1 Cultivo celular primario

El cultivo de neuronas hipocampales se prepararon a partir de embriones de la cepa C57BL/6J obtenidos en la facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Los ratones hembra preñadas fueron previamente mantenidas bajo condiciones estándar de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo luz-oscuridad de 12h Comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité para el Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL-FM) “ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA”, Código BEA 006-2022, de la Universidad de Valparaíso. A los 18 días de gestación se anestesió la hembra preñada con ketamina 10% y xilacina 2% vía intraperitoneal y fue sacrificada por dislocación cervical. Se extrajeron los embriones, los cuales fueron extraídos de los oviductos de la hembra preñada, y pasados a una placa Petri con tampón HBSS-1X frío, los embriones fueron eutanasiados por decapitación, se extrajo el tejido hipocampal y se utilizó para la preparación de cultivos celulares (células gliales y neuronas). Los hipocampos se diseccionaron rápidamente del cerebro en 2 ml de tampón HBSS-1X (en mM: piruvato de sodio 1, HEPES 10 y glucosa al 20 %, tamponado a pH 7,4) a 4°C . Las neuronas se disociaron de forma aguda a 37°C durante 5 min con tripsina al 0,025 % (GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.) Posteriormente, los hipocampos se disociaron mecánicamente utilizando una pipeta pasteur fina. Las neuronas se

sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos previamente con una solución de poli-D-lisina de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, MA, EE. UU.) a una densidad de 100–200 células por mm² en medio de placas (MEM con FBS al 10%, glucosa al 20%, piruvato de sodio 1 mM, Glutamax™ 0,5 mM y penicilina/estreptomicina 100 µg/ml, tamponado a pH 7,2). Después de 1 h, el medio se aspiró de cada pocillo y se reemplazó por un medio de crecimiento compuesto por medio Neurobasal-A (GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.) con un suplemento de B-27 al 2% (GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.), Glutamax™ 1 mM, y penicilina/estreptomicina 100 µg/mL, y mantenido a 37 °C en una incubadora con atmósfera con 99% de humedad y con CO₂ al 5%.

4.6.2 Cultivo línea celular HepG2

Se cultivaron células HepG2, una línea celular de carcinoma hepatocelular humano donado por el Centro de Investigación Clínica Avanzada (CICA) de la Universidad de Chile. Se sembraron las células en medio de Eagle modificado por Dulbecco nutrient mixture F-12 (DMEM- F12 GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.) suplementado con 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, L-glutamina al 1% y suero bovino fetal al 10% (FBS; Invitrogen). Las células se incubaron en recipientes de cultivo celular mantenido a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % atmósfera y 99% de humedad. La influencia del palmitato se investigó añadiendo este reactivo a las células cubiertas en placas de 35 mm.

4.6.7 Diseño Experimental modelo in vitro

El diseño experimental se constituyó de 2 condiciones, de tres experimentos independientes las cuales fueron:

- Cultivo control etanol más BSA
- Cultivo tratamiento con palmitato más BSA

4.6.8 Preparación de palmitato

Los medios que contienen ácidos grasos se prepararon conjugando ácido palmítico (16:0) con albúmina de suero bovino (BSA, A7888 Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) libre de ácidos grasos y sin endotoxinas. Primero, se preparó una solución de albumina de suero de bovino libre de ácidos grasos al 10% en agua desionizada. Se preparó un mínimo de 20 ml de esta solución para que la disolución sea correctamente disuelta en un vaso precipitado, dejando que la BSA se disolviera solo y lentamente desde la superficie, con mediana temperatura. En paralelo, 128 mg de

ácido palmítico (P5585, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) fueron disueltos en 1 ml de etanol de calidad analítica (Winkler, Santiago, Chile) para preparar una solución stock de ácido palmítico de 500 mM 10% de albumina de suero de bovino libre en ácidos grasos (FFA-BSA) fue preparado en DMEM a 37° C y filtrado en un filtro Minisart adosado a una jeringa (Sartorius Stedim, Heidelberg, Alemania). 10 µl de ácido palmítico fueron agregados a 1 ml de BSA vortexeando la solución. PA-BSA fue incubado en un baño de agua destilada a 55° C por 15 minutos. La relación molar de PA-BSA fue de 3.3: 1 (PA: BSA). Las soluciones fueron filtradas finalmente, a través de un filtro de 0.2 µm y almacenadas a -20 °C. El control fue preparado mezclando 10 µl de etanol en 1 ml de BSA libre de ácidos grasos y fue almacenado a -20° C. Al momento de su uso, fue disuelto en un baño de agua destilada a 55° C por 15 minutos, el cual fue utilizado como un control.

4.6.9 Tratamiento con palmitato

De esta solución se añadió 90 µL de palmitato o de solución control por cada 2 ml de DMEM 10% SBF en células HEPG2, se trató por 24 horas, posterior a este tiempo, se recolectó el medio condicionado, filtrándolo en un filtro Minisart adosado a una jeringa (Sartorius Stedim, Heidelberg, Alemania) y guardando a -80°C hasta su uso. Al momento de su uso el medio condicionado se entibió a 37°C en baño y se añadió 50 µL de este medio a cada placa de cultivo primario de neuronas hipocampales por 72 horas.

4.7 INMUNOFLUORESCENCIA CULTIVO CELULAR

Se realiza lavado en tampón PBS-1x a 37°C de las células neuronales y HepG2, posteriormente, las neuronas se fijaron con paraformaldehído-sacarosa al 4% por 15 minutos a 37°C, fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,1% en PBS (Phosphate Buffered Saline: 3,2 mM Na₂HPO₄; 0,5 mM KH₂PO₄; 1,3 mM KCl y 135 mM NaCl) por 30 minutos y posteriormente tratadas con una solución de bloqueo 5% BSA en PBS por 1 hora. Las células se incubaron con los anticuerpos anti-monoclonales NF-κB o COX1 (1:500) y MAP2, GFAP o IBA1 monoclonal (1:500) en 1% BSA durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego las neuronas hipocampales se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo IgG anti-conejo DyLight 488 (1:400) y anti-ratón DyLight 549 (1:500) por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Las células se lavaron con tampón PBS y se les añadió el colorante Hoechst 33258 por 20 minutos. Las neuronas fueron examinadas con un microscopio confocal de barrido láser (Nikon C1 Plus). Las imágenes fueron editadas en el

software EZ-C1 FreeViewer 3.90 y reconstruidas con NissElements Viewer 4.0. Todo lo anterior, se realizó protegiendo la placa de la luz directa.

4.7.1.2 Adquisición de imágenes por microscopía confocal

Para obtener imágenes de las células, los portaobjetos tratados son observados en un microscopio confocal de barrido láser (Nikon C1 Plus) utilizando objetivos de 20X, 40X y 60X. Se tomaron cortes confocales en el eje Z en los objetivos de 60X, utilizando un pinhole de 30 μm y se realizaron cada 0.8 μm en las regiones de interés para obtener imágenes representativas.

4.7.1.2 Análisis de imágenes:

Para el análisis de las imágenes, se utilizó el software Imagej, las imágenes fueron segmentadas para la marca positiva de NF- κ B, COX-2.

Cuantificación: Se empleó el software Image J para analizar imágenes adquiridas con aumentos de 20X y 40X. Se cuantificaron los núcleos de las neuronas marcadas con IBA 1, GFAP y MAP2, midiendo la intensidad de fluorescencia de NF- κ B en los núcleos de las células de manera individual y COX-1 en el área neuronal fuera del núcleo. Posteriormente, se graficó la intensidad promedio de cada marcador en las dos condiciones de cada grupo experimental. Además, se representó el porcentaje del área positiva para la marca en relación con el área total de la imagen adquirida. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el programa estadístico GraphPad. En los gráficos, los valores se presentan como Media $\pm$ SEM.

Obtención de imágenes: Se utilizaron imágenes representativas de cada grupo experimental obtenidas mediante el software Imagej. Para lograr esto, se separaron los canales de todos los cortes confocales del eje Z adquiridos con objetivos de 40X para cada condición. Posteriormente, se combinaron los cortes de cada canal para obtener la proyección en el eje Z correspondiente y se les asignó el color correspondiente a cada canal. De esta manera, se obtuvieron imágenes en RGB para cada uno de los marcadores y una imagen total que los combinaba (Merge). Estas imágenes permitieron observar visualmente las variaciones en las células de interés de cada grupo experimental.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron expresados como promedios $\pm$ error estándar de la media (SEM). En todos los casos, primero se realizó un análisis de distribución para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk). De acuerdo con eso, se realizó una prueba paramétrica (prueba t de dos colas) o una prueba no paramétrica (prueba de Mann-Whitney). Para comparaciones múltiples, se utilizó ANOVA con corrección de Bonferroni post hoc. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $p < 0,05$.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIOS IN VIVO

Parámetros murinométricos en ratas expuestas a HFD

Con el objetivo de validar el modelo experimental y confirmar que la dieta alta en grasas y sacarosa al 5 por ciento de dilución (HFD+SAC 5%) tiene un efecto consistente en el aumento del peso corporal y del tejido adiposo, se realizó una curva de crecimiento. Se observó una pendiente positiva en el incremento de peso tanto en las ratas hembras alimentadas con dieta control como en las expuestas a HFD (Figura 4). En los machos no se observan cambios estadísticamente significativos, sin embargo si hay diferencias entre machos y hembras alimentados con HFD+SAC 5%, lo que se evidenció en un aumento significativo en el peso corporal, entre los días postnatales PND40 hasta el PND62. Además, se observó diferencias entre los grupos experimentales machos controles versus machos HFD+SAC y hembras controles versus hembras HFD+SAC con una mayor cantidad de tejido adiposo gonadal (5A $p < 0.0303$, $p < 0.0090$) y retroperitoneal (Figura 5B, < 0.0303 , $p < 0.0001$ en el PND62 en ambos sexos. Esto indica que la exposición prolongada a la HFD+SAC 5% ocasiona cambios significativos en el peso corporal y en el tejido adiposo periférico, siendo consecuente con la definición de que la obesidad está dada por una acumulación excesiva de tejido adiposo. No se observaron diferencias significativas en el tejido adiposo pardo, el cual es un tejido metabólicamente activo, en las condiciones experimentales alimentadas con HFD+SAC 5% versus control, ni tampoco diferencias sexuales entre grupos (Figura 5C). Se evaluó la cantidad de masa muscular entre los grupos y se observó un aumento en los machos alimentados con HFD+SAC 5% en comparación con las hembras controles (Figura 5D, $p < 0.0303$). Estos resultados son relevantes, ya que demuestran que la exposición a la HFD+SAC 5% genera cambios en la composición corporal, favoreciendo el desarrollo de obesidad en los animales.

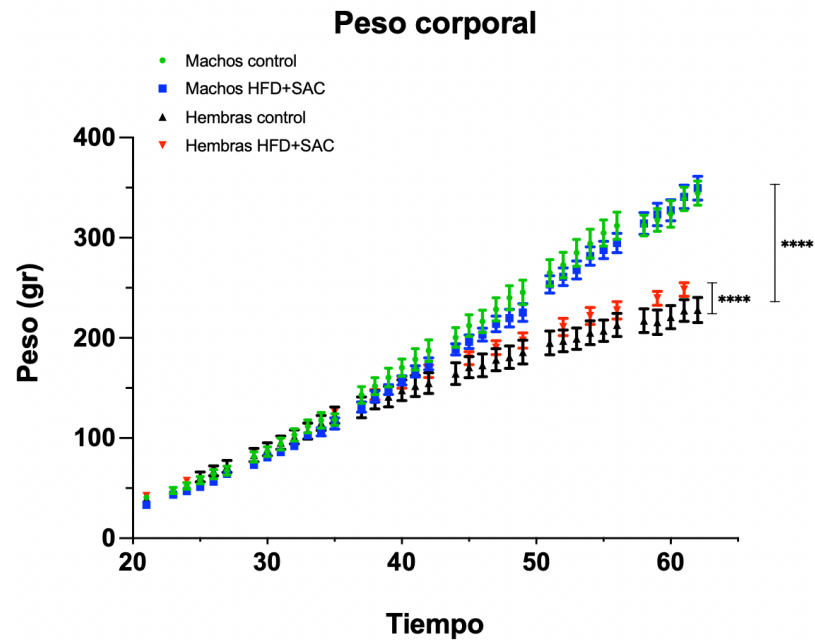


Figura 4. Curva de crecimiento de peso de ratas alimentadas con CHOW DIET y HFD+SAC 5%. El Panel muestra la curva de crecimiento durante seis semanas de ratas control y HFD+SAC. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. DIETA CHOW: dieta normal de control; HFD + SAC 5%, dieta rica en grasas y sacarosa. Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de dos vías de comparaciones múltiples ANOVA, donde se consideraron como significativos los valores con **** $p < 0.0001$.

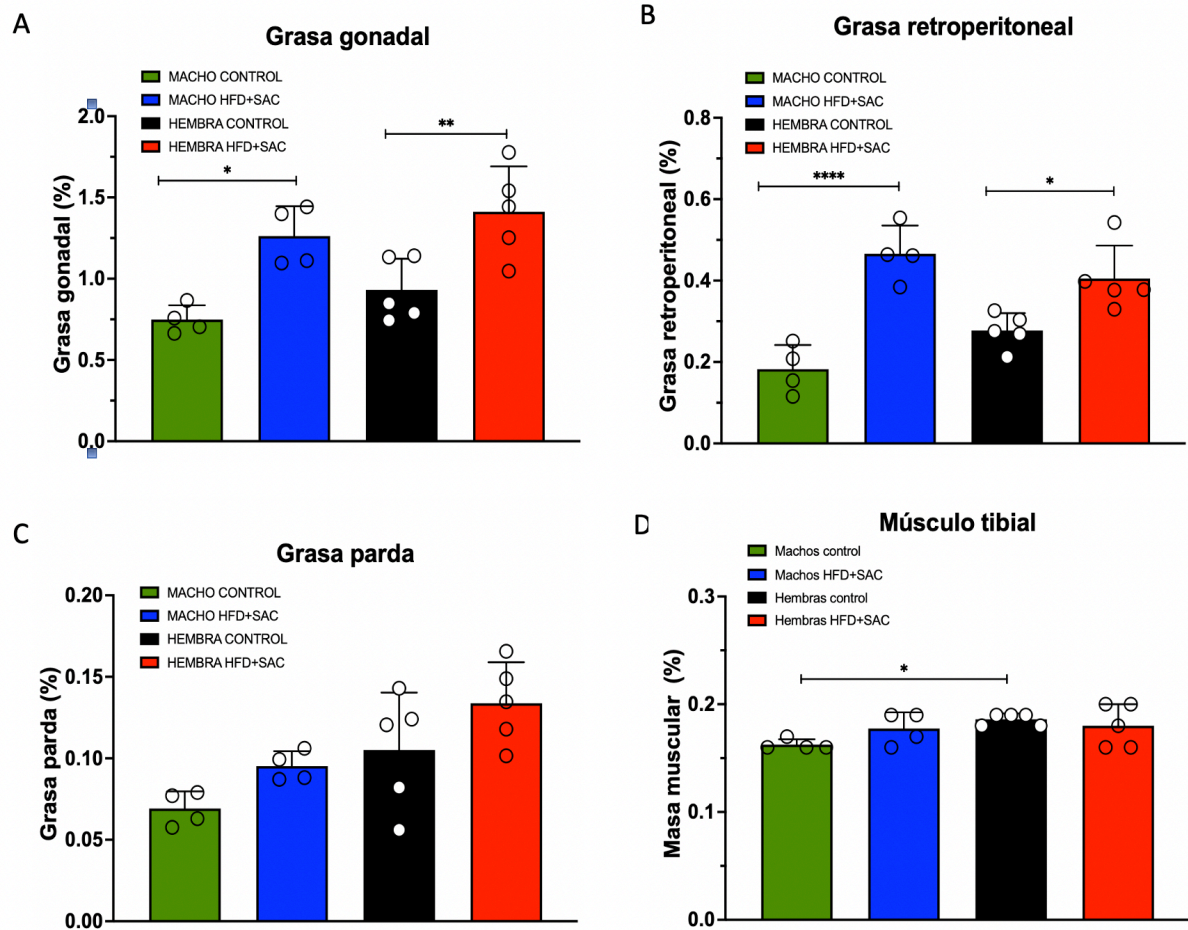


Figura 5. Parámetros murinométricos de ratas alimentadas con CHOW DIET y HFD+SAC 5%. Comparación de (A) peso grasa gonadal, (B) peso grasa retroperitoneal, (C) peso grasa parda, (D) peso músculo tibial en PND 62 en ratas alimentadas durante 6 semanas con DIETA CHOW o HFD+ SAC 5%. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. DIETA CHOW: dieta normal de control; HFD + SAC 5%, dieta rica en grasas y sacarosa. Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de dos vías de comparaciones múltiples ANOVA, donde se consideraron como significativos los valores con * $p < 0.0303$, ** $p < 0.0090$ y *** $p < 0.0001$.

Parámetros metabólicos en ratas expuestas a HFD

En vista de los resultados previos y el comportamiento de los animales que se alimentaron con dieta HFD+SAC 5%, nuestro objetivo fue analizar parámetros metabólicos de relevancia, como la concentración de insulina en suero, mediante la técnica de ELISA. Los resultados indicaron que las hembras que recibieron dieta HFD+SAC 5% presentaron una concentración significativamente mayor de insulina en suero en comparación con las hembras alimentadas con dieta CHOW (Figura 6A, $p < 0.0040$). Sin embargo, en los machos no se observaron diferencias significativas (Figura 6A). Además, se midió la concentración de IL-1 β en suero para evaluar la inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-1 β entre los grupos de hembras y machos (Figura 6B).

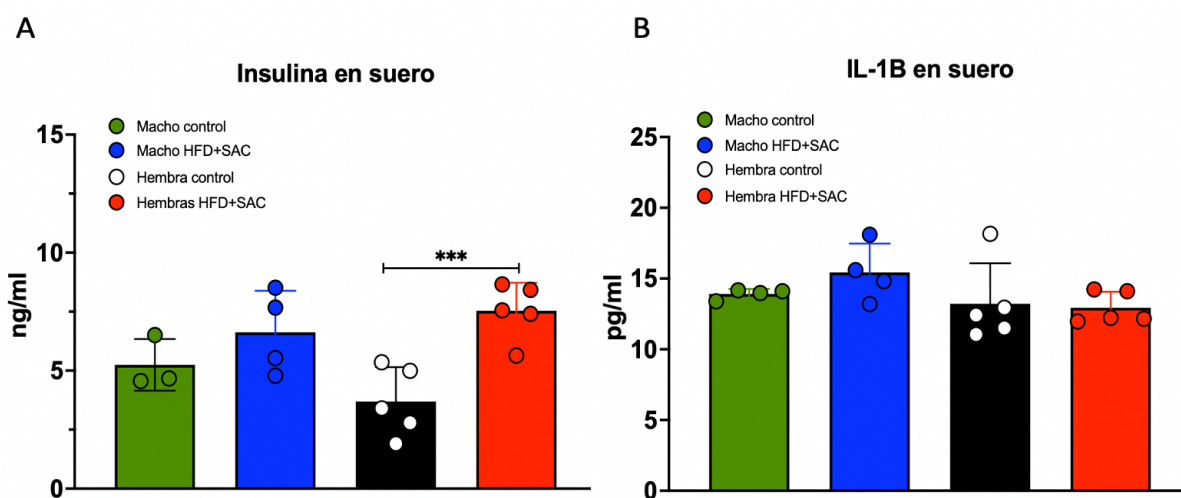


Figura 6. Parámetros metabólicos de ratas alimentadas con CHOW DIET y HFD. Comparación de (a) insulina en suero, (b) comparación de IL-1 β en ratas alimentadas durante 6 semanas con una DIETA CHOW o HFD+ SAC 5%. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM. DIETA CHOW: dieta normal de control; HFD + SAC 5%, dieta rica en grasas y sacarosa. Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba de dos vías de comparaciones múltiples ANOVA, donde se consideraron como significativos los valores con $**p < 0.0040$.

Expresión génica de genes vinculados con la inflamación en Septum lateral

Con base en los antecedentes previamente expuestos, llevamos a cabo un estudio para investigar los efectos de una exposición crónica de 6 semanas a una dieta alta en grasas (HFD) y sacarosa (5%) en el septum lateral, un núcleo cerebral importante, en ratas Sprague Dawley de ambos sexos. Se analizó la expresión de ARNm de genes del inflamosoma NLRP3, incluyendo NLRP3, ASC, Caspasa 1 e IL-1 β , mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados mostraron que la exposición crónica a la dieta HFD+SAC 5% en el tejido cerebral del septum lateral provocó un aumento significativo en la expresión del gen NLRP3 tanto en hembras como en machos alimentados con HFD+SAC 5% (Figura 7A, $p < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen IL-1 β entre los grupos CHOW y HFD+SAC 5% (Figura 7B). Además, se observó una mayor expresión de ARNm del gen Caspasa 1 en machos alimentados con HFD+SAC 5% en comparación con los machos controles (Figura 7C, $p < 0.05$), y se observaron diferencias sexuales en la expresión de este gen en machos y hembras alimentados con la dieta HFD+SAC 5% (Figura 7C, $p < 0.05$). Por último, se analizó la expresión del gen ASC y se encontró un aumento significativo en la expresión en machos alimentados con HFD+SAC 5% en comparación con los machos alimentados con CHOW (Figura 7D, $p < 0.05$), y se observó una mayor expresión de este gen en machos que en hembras alimentados con HFD+SAC 5% (Figura 7D, $p < 0.004$).

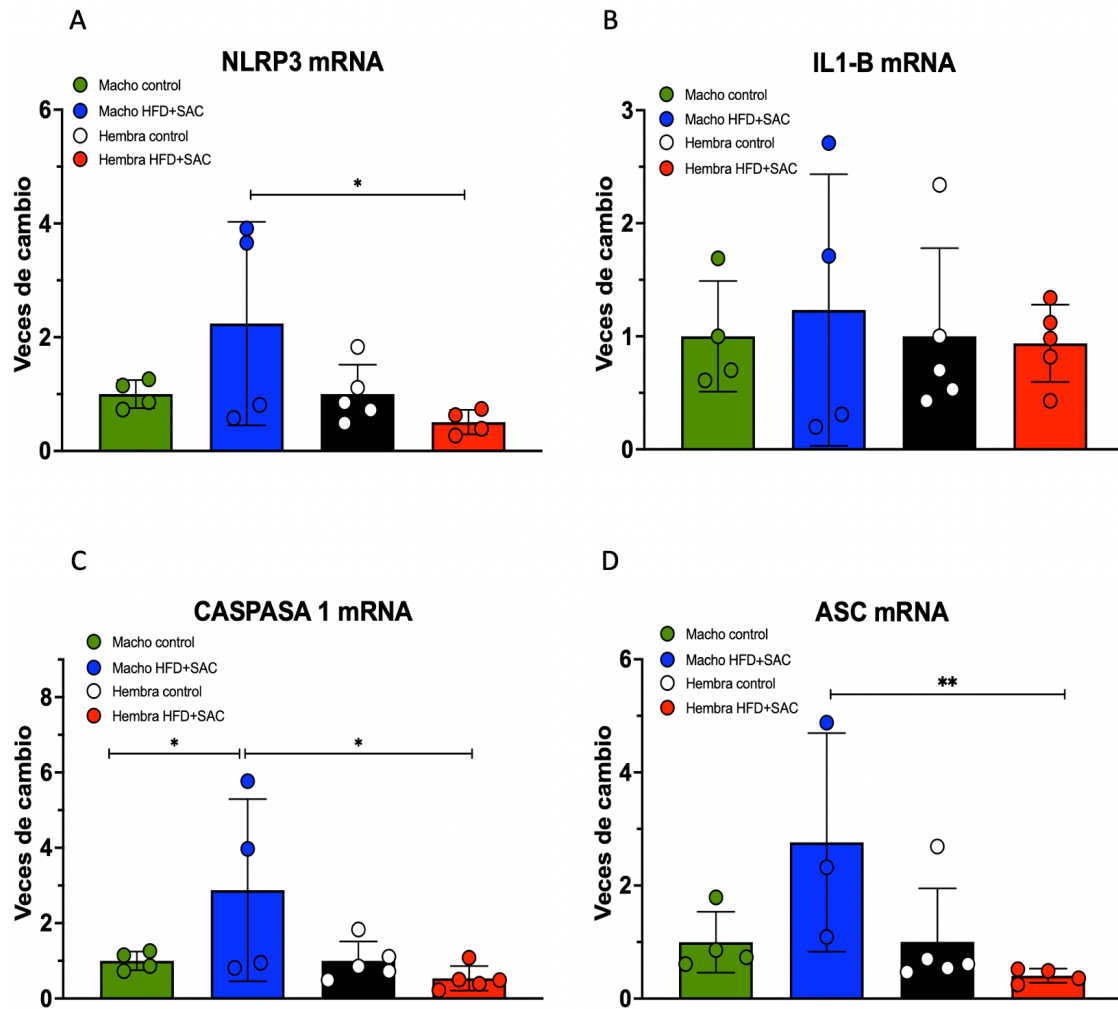


Figura 7. Expresión del inflamosoma NLRP3 en septum lateral de ratas alimentadas con Chow Diet y HFD+SAC 5%. Septum lateral se recolectó de ratas alimentadas con dieta Chow o HFD, y se midió el nivel de ARNm del inflamosoma NLRP3 se evaluó mediante RT-qPCR y se normalizó con el gen constitutivo 18s. Comparación de los niveles de ARNm de (a) NLRP3, (b) IL1- β (c) pro-caspasa-1 y (d) ASC. La expresión de IL1-B no cambió significativamente después de 6 semanas de HFD. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM (n = 5). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,004$ frente a HFD, determinado por el análisis estadístico de la prueba ANOVA de dos vías. Dieta Chow: dieta de control normal; HFD+SAC 5%, dieta rica en grasas y sacarosa.

5.2 ESTUDIOS IN VITRO

Respuesta in vitro de células hepáticas humanas al tratamiento con palmitato

Para investigar la respuesta inflamatoria al ácido palmítico, presente en concentraciones elevadas en la obesidad, se diseñó un modelo de obesidad in vitro utilizando células HepG2. Se aplicó un tratamiento con ácido palmítico para simular la respuesta metabólica hepática asociada a una dieta alta en grasas. Se analizó la liberación de IL-6 por parte de los hepatocitos después de 24 horas de tratamiento con palmitato a 100 μ M, utilizando la técnica de ELISA. No se observaron diferencias significativas entre las condiciones de control y tratamiento (Figura 8A-B-C). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en la condición de tratamiento con palmitato. Luego, se realizó inmunofluorescencia para evaluar la translocación del factor de transcripción NF κ B en las células HepG2 tratadas con palmitato. Se observó una formación de clúster y una disminución en el área celular en las células tratadas con palmitato (Figura 9A). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de la translocación nuclear de NF κ B (Figura 9B), lo que sugiere que el efecto del palmitato a concentraciones fisiológicas durante 24 horas de tratamiento afecta la levemente la morfología celular y no la translocación nuclear del factor de transcripción NF κ B.

Para el siguiente experimento, se recolectó el medio condicionado de las células HepG2 control y tratadas en respuesta al palmitato, con el objetivo de analizar su efecto en células de cultivo primario de ratón.

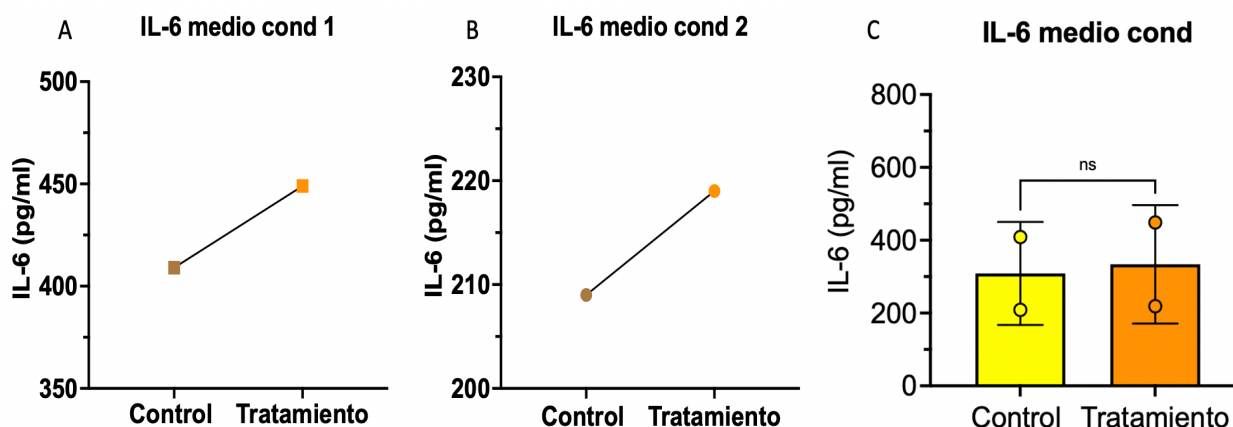


Figura 8. El palmitato genera respuestas leves en la concentración de IL-6 en medio condicionado de células HEPG2. IL-6 aumenta levemente en medio de crecimiento en células HEPG2 inducida por palmitato (PA). Las células HepG2 se trataron con palmitato a 100 μ M durante 24 h. (A)(B) Comparación de IL-6 en medio condicionado con palmitato (C) Concentración de IL-6 de ambos medios condicionados se graficó de SD.

Las diferencias estadísticamente se analizaron entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante t test unidireccional seguido de la prueba de comparación de la U de Mann-Whitney.

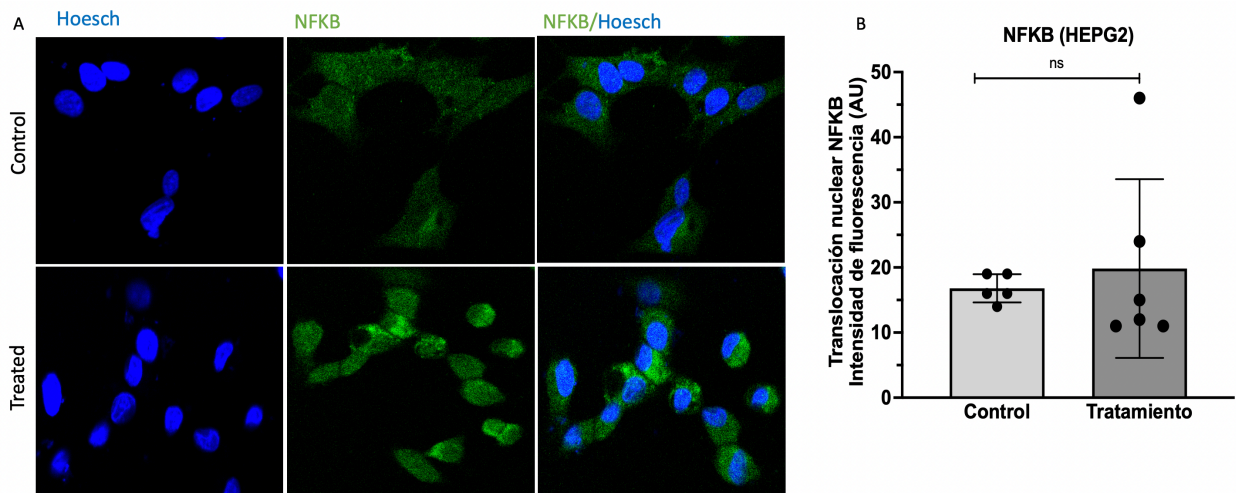


Figura 9. El palmitato genera respuestas modestas en la expresión de NFκB en células HEPG2. (A) Imágenes representativas de la fluorescencia de NFκB en células HepG2 tratadas con vehículo o palmitato, (B) Cuantificación intensidad de fluorescencia de NFκB en núcleo. Los valores corresponden a la media ± SE de tres experimentos independientes (n = 3, correspondientes a cultivos de 3 pasajes, cada condición se probó al menos por duplicado). Las diferencias estadísticamente se analizaron entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante t test unidireccional seguido de la prueba de comparación de la U de Mann-Whitney.

Respuesta inflamatoria de células hipocampales y gliales a tratamiento con medio condicionado con palmitato.

Para examinar el impacto del medio condicionado con palmitato en las células, se realizó cultivo primario de hipocampo de ratones. Tras siete días desde la extracción de células hipocampales, se sometió a las células a un tratamiento con el medio condicionado recolectado a partir de células HepG2 y se incubó durante 72 horas. Después de este tiempo, las células fueron fijadas y se analizó mediante inmunofluorescencia la translocación de NFκB en neuronas marcadas con MAP2. En este primer experimento se observó una diferencia estadísticamente significativa en la translocación de NFκB al núcleo (Figura 10A-B, $p < 0.0344$), lo que indica que las neuronas responden activando la translocación nuclear del factor NFκB, que favorece la expresión de citoquinas inflamatorias presentes en la condición de obesidad. Para continuar evaluando la respuesta al tratamiento con palmitato, se analizó la expresión de COX1 en astrocitos marcados con GFAP. En este experimento, se observó que los astrocitos responden expresando mayormente

COX1 en respuesta al palmitato en comparación con el control (Figura 11A-B, $p < 0.0144$). Por último, se analizó NFκB en células gliales marcadas con IBA1. En este caso, al igual que en los astrocitos, se observó un aumento de la respuesta con el tratamiento de palmitato, mostrando una mayor translocación nuclear de NFκB en la condición de tratamiento (Figura 12A-B, $p < 0.0006$). Esto indica que existe una mayor actividad inflamatoria en respuesta al medio condicionado que simula un estado de inflamación sistémica presente en condiciones de obesidad.

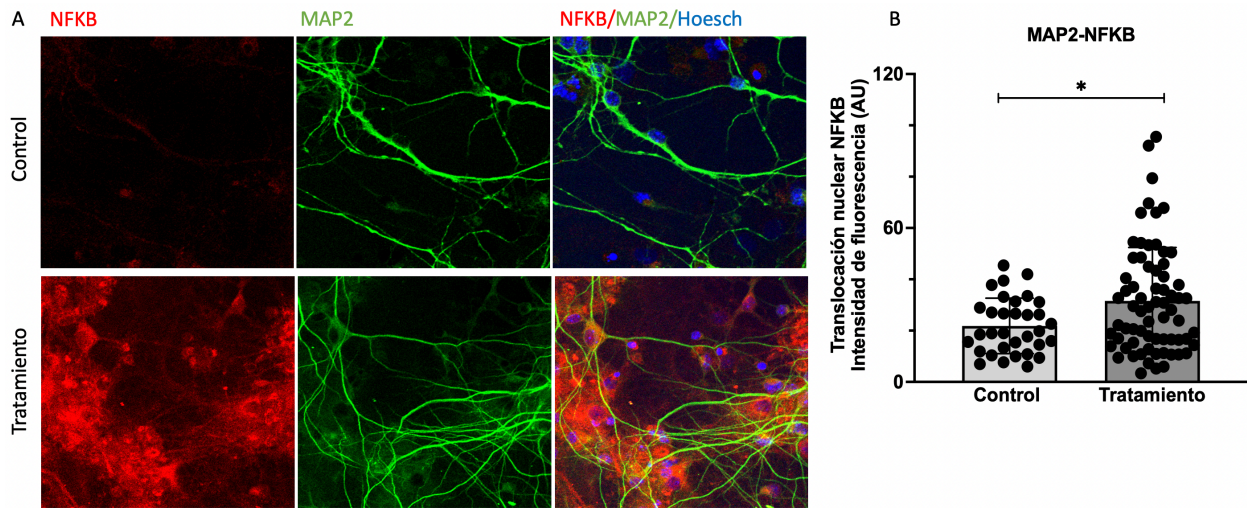


Figura 10. Efectos de medio condicionado genera aumento de marcadores de inflamación en cultivos primarios de hipocampo. Imágenes de fluorescencia (A) inmunofluorescencia MAP2- NFκB control y tratamiento, (B) Cuantificación de NFκB de cultivos primarios de hipocampo neuronal (13–15 DIV) incubados durante 72 h en presencia del medio condicionado control o tratado previamente con palmitato. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Los valores corresponden a la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes ($n = 3$, correspondientes a cultivos de 3 animales diferentes; en todos los experimentos, cada condición se probó al menos por duplicado). Las diferencias estadísticas se analizaron entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante t test unidireccional seguido de la prueba de comparación de la U de Mann-Whitney (* $p < 0,0344$ en comparación con el control).

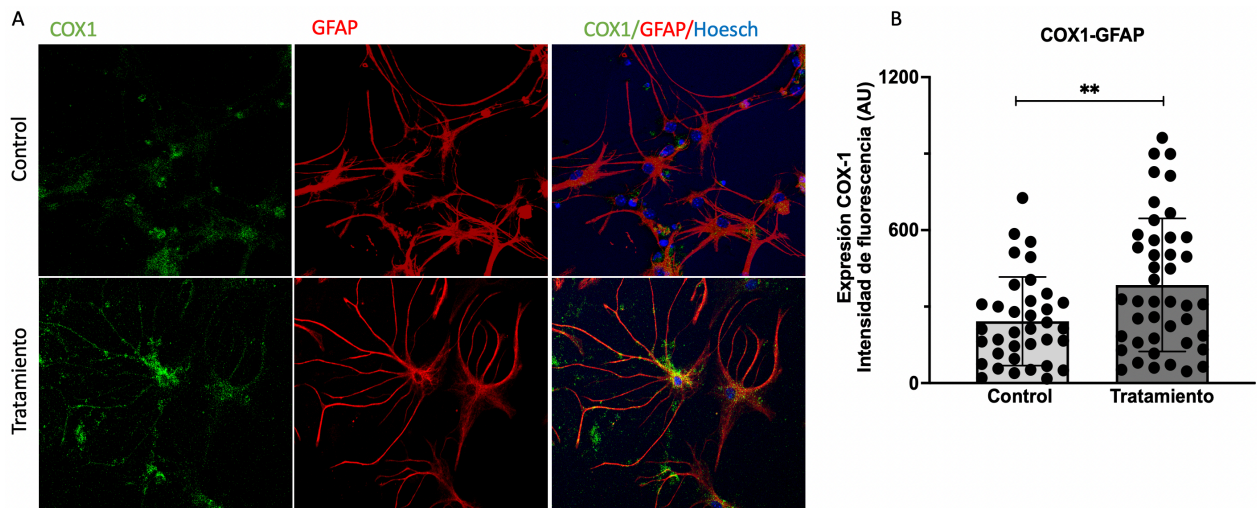


Figura 11. El medio condicionado provoca un incremento en marcador de neuroinflamación COX1 en cultivos primarios de neurona y astrocitos en el hipocampo. Imágenes de fluorescencia (A) inmunofluorescencia GFAP-COX1 control y tratamiento, (B) Cuantificación de COX1 de cultivos primarios de hipocampo neuronal (13–15 DIV) incubados durante 72 h en presencia del medio condicionado control o tratado previamente con palmitato. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Los valores corresponden a la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes ($n = 3$, correspondientes a cultivos de 3 animales diferentes; en todos los experimentos, cada condición se probó al menos por duplicado). Las diferencias estadísticas se analizaron entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante t test unidireccional seguido de la prueba de comparación de la U de Mann-Whitney (** $p < 0,0144$ en comparación con el control).

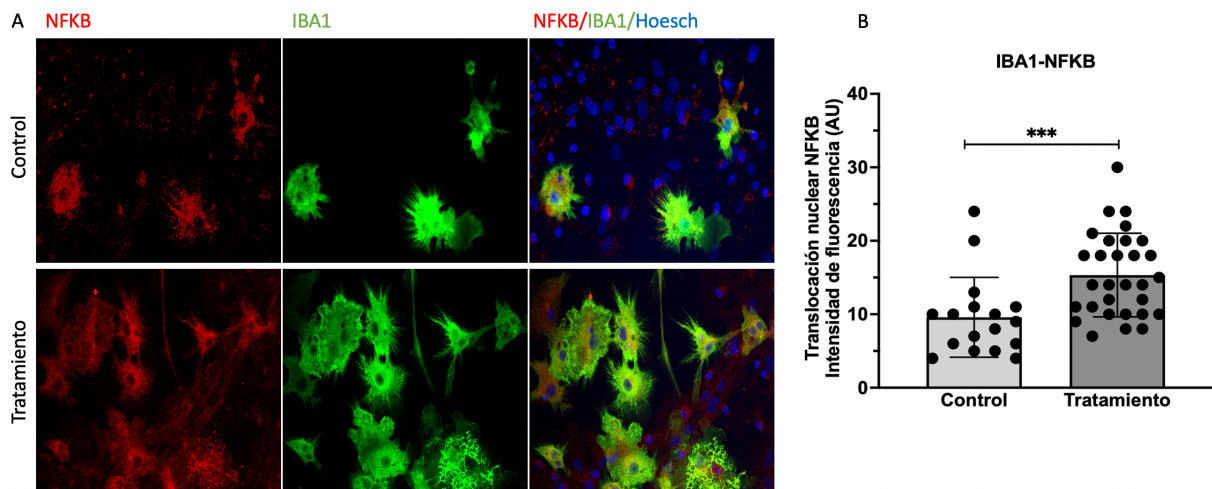


Figura 12. El medio condicionado produce un aumento en la translocación de NFkB en cultivos primarios de neurona y microglía en el hipocampo. Imágenes de fluorescencia (A) inmunofluorescencia IBA1- NFkB control y tratamiento, (B) Cuantificación de NFkB de cultivos primarios de hipocampo neuronal (13–15 DIV) incubados durante 72 h en presencia del medio condicionado control o tratado previamente con palmitato. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. Los valores corresponden a la media $\pm$ SE de tres experimentos independientes ($n = 3$, correspondientes a cultivos de 3 animales diferentes; en todos los experimentos, cada condición se probó al menos por duplicado). Las diferencias estadísticas se analizaron entre las condiciones experimentales se evaluaron mediante t test unidireccional seguido de la prueba de comparación de la U de Mann-Whitney (** $p < 0,0006$ en comparación con el control).

CAPITULO 6. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis demuestran de manera consistente que la dieta HFD+SAC 5% provoca un aumento significativo en el peso corporal de las ratas hembras (Figura 4). Sin embargo, este efecto no se observó en los machos. Al analizar la composición corporal y las diferencias en la acumulación de tejido adiposo, se encontraron diferencias marcadas entre los grupos control y HFD+SAC, especialmente en el tejido adiposo gonadal y retroperitoneal (Figura 5A-B). Además, se observó un incremento en la cantidad de masa muscular en los machos alimentados con HFD+SAC 5% en comparación con las hembras que recibieron la misma dieta (Figura 5D). Esta diferencia sexual es esperada, dado que los machos tienden a ganar más masa muscular en comparación con las hembras. A primera vista, esto podría interpretarse como beneficioso, considerando que el tejido muscular es metabólicamente activo. Sin embargo, al considerar los resultados de la masa grasa, se observa una mayor acumulación de tejido adiposo blanco gonadal y retroperitoneal en los machos, y se observa un fenómeno similar en las hembras. Estos hallazgos son una característica clásica de la obesidad ¹.

Luego se analizó parámetros metabólicos. Además, las hembras HFD+SAC 5% presentaron una mayor concentración de insulina en suero (Figura 6A), lo que sugiere presencia de insulino resistencia, y con ello activación de mecanismos inflamatorios con posibles implicaciones en la salud metabólica, una condición clínica común en obesidad ⁶⁶. Dentro de los parámetros metabólicos se evaluó la concentración de IL-1 β , en este análisis no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL-1 β en suero (Figura 6B), esto podría indicar una inflamación crónica de bajo grado de difícil detección, por lo que sería interesante analizar la concentración en suero de otras interleucinas vinculadas con la obesidad como IL-6, TNF- α ²⁹.

La exposición crónica a la dieta HFD+SAC 5% también resultó en un aumento significativo en la expresión del gen NLRP3 en el tejido cerebral del septum lateral entre machos y hembras alimentados con HFD+SAC 5% (Figura 7A), esta diferencia sexual puede deberse a la acción de los andrógenos, hormonas que contribuyen al crecimiento y reproducción, específicamente en machos los niveles de estrógenos se encuentran más elevados que en hembras, muchos estudios han demostrado que los andrógenos influyen en la activación del inflamósoma NLRP3. Por ejemplo, la testosterona puede activar directamente el NLRP3 en algunas enfermedades y su exceso

puede inducir a la producción de ROS y con ello activar NLRP3 ⁹⁵. Por el otro lado, el estrógeno se ha visto que exhibe efectos protectores en el cerebro al inhibir el inflamosoma NLRP3, y también demuestra efectos tanto a nivel de mRNA como de proteína ^{96,97}, lo que podría explicar estas diferencias entre machos y hembras HFD+SAC 5%, en este contexto los machos tendrían un posible impacto en la función cerebral y en la inflamación crónica de bajo grado mayor que las hembras. El NLRP3 consta de un complejo multiproteico en conjunto con proteínas como ASC y caspasa 1, se midió ARNm de estas proteínas y se observó diferencias estadísticamente significativas en el aumento del estado estacionario de ARNm de ASC y caspasa 1 en los machos alimentados con HFD+SAC 5% en comparación con los CHOW DIET (Figura 7C-D), lo que es coherente con el resultado de NLRP3 y el fenómeno explicado anteriormente, lo cual confirma que, hay un mayor señal de cebado, que es una mayor expresión primer paso para la activación de NLRP3, y con ello el desarrollo de la inflamación, por ende, los machos podrían ser más susceptibles a la inflamación a nivel del cerebral por la acción de NLRP3 ^{98 99}. Los resultados de esta tesis son consistentes con la definición de obesidad como una acumulación excesiva de tejido adiposo y demuestran que la exposición prolongada a la dieta HFD+SAC 5% ocasiona cambios significativos en la composición corporal de las ratas. La diferencia sexual en algunos de los parámetros evaluados sugiere que el género puede tener un impacto en la respuesta metabólica a la dieta. La observación de hiperinsulinemia en las hembras alimentadas con HFD+SAC 5% sugiere la presencia de mecanismos inflamatorios, lo que podría tener implicaciones en la salud metabólica. Además, el aumento en la expresión del gen NLRP3 en el septum lateral indica que la dieta HFD+SAC 5% también podría tener un impacto en la función cerebral, específicamente en la inflamación crónica de bajo grado. En conjunto, estos resultados proporcionan información valiosa sobre los efectos de la dieta HFD+SAC 5% en ratas, y sugieren que la exposición prolongada a esta dieta puede tener implicaciones negativas para la salud metabólica y cerebral.

La obesidad es una condición cada vez más prevalente en todo el mundo, y se ha demostrado que está estrechamente relacionada con la inflamación crónica de bajo grado en diversos tejidos, incluyendo el hipocampo, que es una región cerebral importante para la memoria y el aprendizaje ¹⁰⁰. En este estudio, recreamos en un modelo in vitro la respuesta sistémica hepática de la alimentación alta en grasas y analizamos la respuesta de las células hepáticas humanas, así como las células hipocampales y gliales de ratón a la exposición al palmitato, un ácido graso presente en grandes concentraciones en la obesidad ⁷⁵. En nuestra investigación, encontramos que la exposición

de células hepáticas humanas a una concentración fisiológica de palmitato no produjo diferencias estadísticamente significativas en la liberación de IL-6 (Figura 8A-B-C), una citoquina inflamatoria conocida por su papel en la obesidad ¹⁰¹. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en la condición de tratamiento (Figura 8A-B). A pesar de la falta de cambios significativos en la liberación de IL-6, se observó un cambio morfológico en las células tratadas con palmitato (Figura 9A), lo que indica que las células podrían responder al estímulo inflamatorio en el que probablemente participan otros factores proinflamatorios como CCL2 (El ligando de quimiocina CC 2), IL-18, TNF- α ^{102,103}.

En el siguiente experimento, evaluamos el efecto del medio condicionado con palmitato en células hipocampales y gliales de ratón. Nuestros resultados mostraron una translocación nuclear significativamente mayor de NF κ B en las neuronas tratadas con el medio condicionado (Figura 10A-B), lo que indica una mayor activación del factor de transcripción y una posible inflamación en el hipocampo. Además, se observó una mayor expresión de COX1 en astrocitos en respuesta al palmitato en comparación con el control (Figura 11A-B), COX1 es una ciclooxigenasa vinculada con procesos inflamatorios y oxidativos que contribuyen al daño neuronal ¹⁰⁴, no está muy bien estudiado su rol en un contexto de obesidad en comparación a COX2, ciclooxigenasa ampliamente estudiada en obesidad, ya que, en hipocampo se ha reportado que se encuentra aumentada en contexto obesogénico ²⁹ generando aberraciones neuronales. Esto abre un espacio para evaluar el rol de COX 1 en la promoción de la inflamación en obesidad. Por último, se evaluó en células gliales la translocación del factor de NF κ B al núcleo y este se encontró aumentado en la condición tratamiento con palmitato (Figura 12 A-B), lo que sugiere una mayor actividad inflamatoria en estas células, observándose una astrogliosis en respuesta a la obesidad ⁶². En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición al palmitato puede desencadenar una respuesta inflamatoria en células hepáticas y en el hipocampo, lo que puede contribuir a la inflamación crónica de bajo grado observada en la obesidad. La astrocitosis es particularmente importante, ya que, existe evidencia de que la astrogliosis puede estar relacionada con la obesidad y los trastornos metabólicos asociados. En estudios con animales, se ha demostrado que la activación astrocitaria en el hipotálamo e hipocampo, puede producir un estado inflamatorio y disfunción neuronal en respuesta a una dieta rica en grasas y obesidad, y genera alteraciones en la reducción del tono GABA por consecuencia de la sobreactivación de los receptores metabotrópicos de glutamato por el exceso de glutamato ^{14,105}. El desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibitoria podría generar

alteraciones en el comportamiento de la alimentación ¹⁴. Esta respuesta puede llevar a cambios en la regulación del apetito, el gasto energético y otros procesos metabólicos que favorecen la ganancia de peso. Nuestros hallazgos también indican que las células hipocampales y gliales pueden ser particularmente vulnerables a la exposición al palmitato, lo que podría afectar la función cerebral y contribuir a los síntomas cognitivos asociados con la obesidad.

LIMITACIONES/PROYECCIONES FUTURAS:

Sería interesante y queda pendiente evaluar la glicemia e insulina en ayuno para determinar el índice HOMA (modelo de evaluación homeostática), el cual nos permitiría estimar la resistencia a la insulina y la función de las células beta en los individuos. Este índice se basa en medir los niveles de glucosa e insulina en ayunas y utilizar estos valores para calcular el índice HOMA-IR (resistencia a la insulina). El cálculo del HOMA-IR se realiza multiplicando la insulina en ayunas ($\mu\text{U/mL}$) por la glucosa en ayunas (mmol/L) y dividiendo el resultado por 22.5¹⁰⁶. Estos valores serían clave para determinar si las ratas desarrollaron resistencia a la insulina, lo cual es fundamental para confirmar la iniciación de la inflamación crónica de bajo grado. Además, sería interesante llevar a cabo experimentos utilizando ovariectomía para analizar si las hembras estarían más protegidas debido al efecto hormonal. Hasta ahora, se ha demostrado que las hormonas ováricas son capaces de modular la respuesta inflamatoria, disminuyéndola y afectando mediadores inflamatorios como las citoquinas⁹⁷. Sin embargo, se requiere más información sobre el mecanismo en condiciones de obesidad.

Por otro lado, es importante mencionar que una limitación del estudio es que no se realizó un control de la ingesta de alimentos en los animales. Controlar la ingesta permitiría tener un mejor entendimiento de cómo la dieta alta en grasas y sacarosa afecta los resultados y cómo se relaciona con los cambios observados en los marcadores de inflamación. Estas consideraciones abren oportunidades para futuras investigaciones y ampliar nuestro conocimiento sobre los efectos de la dieta y los mecanismos implicados en la inflamación crónica de bajo grado.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

A pesar de no encontrar una afirmación directa de la hipótesis planteada en esta tesis, si se obtuvieron resultados que sugieren la existencia de una compleja interacción entre la dieta obesogénica, la inflamación y los efectos en el cerebro. Aunque no se observó un aumento de concentración sanguínea de IL1-b, se detectaron cambios significativos en la composición corporal, la concentración de insulina en suero y la expresión de genes relacionados con la inflamación en diferentes tejidos. Estos hallazgos desafían parcialmente la hipótesis inicial, que postulaba un aumento de la expresión de genes asociados a NLRP3 como mecanismo inflamatorio central entre condiciones experimentales. Sin embargo, la activación del inflamosoma y los cambios en la expresión de otros genes inflamatorios sugieren que la inflamación crónica de bajo grado puede estar presente en el contexto de la dieta HFD+SAC 5%. Además, los efectos observados en las células hepáticas y neuronales respaldan la hipótesis de que la dieta obesogénica puede tener repercusiones en la función cerebral. Estos resultados subrayan la complejidad de los mecanismos inflamatorios relacionados con la obesidad y resaltan la necesidad de seguir investigando para comprender completamente las interacciones entre la dieta, la inflamación y el cerebro. En última instancia, este trabajo nos acerca a una mejor comprensión de los efectos sistémicos de la obesidad y abre nuevas vías para abordar sus consecuencias metabólicas y cerebrales.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Informe sobre la salud en el Mundo 2010. In: Salud OMdl editor. 2010. Preprint at https://www.who.int/whr/2010/10_summary_es.pdf?ua=1.
2. Chooi, Y. C., Ding, C. & Magkos, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. **92**, 6–10 (2019).
3. Moreno, M. P. L. INFORME MAPA NUTRICIONAL 2021 – UNIDAD DE ESTUDIOS – JUNAEB.
4. Swinburn, B. A. *et al.* The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *The Lancet* **393**, 791–846 (2019).
5. Stice, E., Marti, C. N. & Rohde, P. Prevalence, incidence, impairment, and course of the proposed DSM-5 eating disorder diagnoses in an 8-year prospective community study of young women. *J. Abnorm. Psychol.* **122**, 445–457 (2013).
6. Song, X., Pérez-Cueto, F. J. A. & Bredie, W. L. P. Food Desires and Hedonic Discrimination in Virtual Reality Varying in Product–Context Appropriateness among Older Consumers. *Foods* **11**, 3228 (2022).
7. Piché, M.-E., Tchernof, A. & Després, J.-P. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* **126**, 1477–1500 (2020).
8. Galicia-Garcia, U. *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6275 (2020).
9. Stephens, J. M., Lee, J. & Pilch, P. F. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**, 971–976 (1997).
10. Akiyama, H. *et al.* Inflammation and Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 383–421 (2000).
11. Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. & Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor

- alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4854–4858 (1994).
12. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **25**, 4–7 (2004).
 13. Kenny, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* **69**, 664–679 (2011).
 14. Obara-Michlewska, M. The contribution of astrocytes to obesity-associated metabolic disturbances. *J. Biomed. Res.* **36**, 299–311 (2022).
 15. Ziauddeen, H., Alonso-Alonso, M., Hill, J. O., Kelley, M. & Khan, N. A. Obesity and the Neurocognitive Basis of Food Reward and the Control of Intake¹². *Adv. Nutr.* **6**, 474–486 (2015).
 16. Kalivas, P. W. & Volkow, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1403–1413 (2005).
 17. Egecioglu, E. *et al.* Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **12**, 141–151 (2011).
 18. Johnson, S. W. & North, R. A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **12**, 483–488 (1992).
 19. Gysling, K. & Wang, R. Y. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res.* **277**, 119–127 (1983).
 20. Di Chiara, G. & Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5274–5278 (1988).
 21. Tanda, G., Pontieri, F. E. & Chiara, G. D. Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism. *Science* **276**, 2048–2050 (1997).
 22. Kalivas, P. W. & Volkow, N. D. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* **162**, 1403–1413 (2005).
 23. Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R. & Telang, F. Imaging dopamine's role

in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* **56**, 3–8 (2009).

24. Maya-Monteiro, C. M. *et al.* Lipid Droplets Accumulate in the Hypothalamus of Mice and Humans with and without Metabolic Diseases. *Neuroendocrinology* **111**, 263–272 (2020).

25. Posey, K. A. *et al.* Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **296**, E1003–E1012 (2009).

26. Tang, Y., Purkayastha, S. & Cai, D. Hypothalamic Micro-inflammation: A Common Basis of Metabolic Syndrome and Aging. *Trends Neurosci.* **38**, 36–44 (2015).

27. Talishinsky, A. & Rosen, G. D. Systems Genetics of the Lateral Septal Nucleus in Mouse: Heritability, Genetic Control, and Covariation with Behavioral and Morphological Traits. *PLoS ONE* **7**, e44236 (2012).

28. Tang, Y., Purkayastha, S. & Cai, D. Hypothalamic microinflammation: a common basis of metabolic syndrome and aging. *Trends Neurosci.* **38**, 36–44 (2015).

29. Guillemot-Legris, O. & Muccioli, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci.* **40**, 237–253 (2017).

30. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 98–107 (2011).

31. Cook, D. G. *et al.* C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **149**, 139–150 (2000).

32. Feingold, K. R. *et al.* Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.* **83**, 1116–1121 (1989).

33. Yuan, M. *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673–1677 (2001).

34. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91 (1993).

35. Arkan, M. C. *et al.* IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat.*

Med. **11**, 191–198 (2005).

36. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333–336 (2002).
37. Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1793–1801 (2006).
38. Chen, Q. *et al.* Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PloS One* **7**, e42971 (2012).
39. Shoelson, S. E., Lee, J. & Yuan, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **27 Suppl 3**, S49-52 (2003).
40. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 367–377 (2008).
41. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
42. Takikawa, A. *et al.* HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes* **65**, 3649–3659 (2016).
43. McLaughlin, T., Ackerman, S. E., Shen, L. & Engleman, E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 5–13 (2017).
44. Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 738–749 (2011).
45. Wentworth, J. M. *et al.* Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* **59**, 1648–1656 (2010).
46. Houstis, N., Rosen, E. D. & Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944–948 (2006).
47. Frontiers | The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01638/full>.

48. Hotamisligil, G. S. & Erbay, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 923–934 (2008).
49. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 3015–3025 (2006).
50. Polyzos, S. A., Kountouras, J. & Mantzoros, C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* **92**, 82–97 (2019).
51. Meex, R. C. R. & Watt, M. J. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 509–520 (2017).
52. Donnelly, K. L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
53. Seidman, J. S. *et al.* Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* **52**, 1057-1074.e7 (2020).
54. Obstfeld, A. E. *et al.* C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes* **59**, 916–925 (2010).
55. Morinaga, H. *et al.* Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes* **64**, 1120–1130 (2015).
56. Nguyen-Lefebvre, A. T. & Horuzsko, A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J. Enzymol. Metab.* **1**, 101 (2015).
57. Sanders, F. W. B. & Griffin, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **91**, 452–468 (2016).
58. Talukdar, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* **18**, 1407–1412 (2012).
59. Todoric, J. *et al.* Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat. Metab.* **2**, 1034–1045 (2020).
60. Nakagawa, H. *et al.* ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* **26**, 331–343 (2014).

61. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
62. Douglass, J. D., Dorfman, M. D., Fasnacht, R., Shaffer, L. D. & Thaler, J. P. Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Mol. Metab.* **6**, 366–373 (2017).
63. Stienstra, R. *et al.* Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15324–15329 (2011).
64. Gupta, S., Knight, A. G., Gupta, S., Keller, J. N. & Bruce-Keller, A. J. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* **120**, 1060–1071 (2012).
65. Fritsche, K. L. The science of fatty acids and inflammation. *Adv. Nutr. Bethesda Md* **6**, 293S–301S (2015).
66. De Souza, C. T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192–4199 (2005).
67. Zhang, X. *et al.* Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **135**, 61–73 (2008).
68. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**, 278–286 (2012).
69. Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241 (2006).
70. López-Reyes, A. *et al.* NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19. *Front. Immunol.* **11**, 570251 (2020).
71. Lainez, N. M. & Coss, D. Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. *Endocrinology* **160**, 2719–2736 (2019).
72. Lee, Y. S., Wollam, J. & Olefsky, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. *Cell* **172**, 22–40 (2018).
73. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).

74. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* **13**, 11–22 (2011).
75. Melo, H. M. *et al.* Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α . *Cell Rep.* **30**, 2180-2194.e8 (2020).
76. Carta, G. *et al.* Dietary Triacylglycerols with Palmitic Acid in the sn-2 Position Modulate Levels of N-Acylethanolamides in Rat Tissues. *PLoS ONE* **10**, e0120424 (2015).
77. Pilitsis, J. G. *et al.* Quantification of free fatty acids in human cerebrospinal fluid. *Neurochem. Res.* **26**, 1265–1270 (2001).
78. Yang, Y. *et al.* Palmitate lipotoxicity is closely associated with the fatty acid-albumin complexes in BV-2 microglia. *PLOS ONE* **18**, e0281189 (2023).
79. Karmi, A. *et al.* Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes* **59**, 2171–2177 (2010).
80. Valdearcos, M. *et al.* Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep.* **9**, 2124–2138 (2014).
81. Milanski, M. *et al.* Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 359–370 (2009).
82. Thaler, J. P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 153–162 (2012).
83. Marwarha, G., Claycombe, K., Schommer, J., Collins, D. & Ghribi, O. 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 (2016).
84. Cheng, L. *et al.* Palmitic acid induces central leptin resistance and impairs hepatic glucose and lipid metabolism in male mice. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 541–548 (2015).
85. Benoit, S. C. *et al.* Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* **119**, 2577–2589 (2009).

86. Ho, A. J. *et al.* Obesity is linked with lower brain volume in 700 AD and MCI patients. *Neurobiol. Aging* **31**, 1326–1339 (2010).
87. Gustafson, D. Adiposity indices and dementia. *Lancet Neurol.* **5**, 713–720 (2006).
88. Gustafson, D., Lissner, L., Bengtsson, C., Björkelund, C. & Skoog, I. A 24-year follow-up of body mass index and cerebral atrophy. *Neurology* **63**, 1876–1881 (2004).
89. Ronan, L. *et al.* Obesity associated with increased brain age from midlife. *Neurobiol. Aging* **47**, 63–70 (2016).
90. Ward, M. A., Carlsson, C. M., Trivedi, M. A., Sager, M. A. & Johnson, S. C. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol.* **5**, 23 (2005).
91. Hotamisligil, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665–668 (1996).
92. Mayer, C. M. & Belsham, D. D. 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 (2010).
93. Nakamura, S. *et al.* Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **284**, 14809–14818 (2009).
94. Yuzefovych, L., Wilson, G. & Racheck, L. 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**, E1096–1105 (2010).
95. Ma, X. *et al.* Androgen aggravates liver fibrosis by activation of NLRP3 inflammasome in CCl₄-induced liver injury mouse model. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **318**, E817–E829 (2020).
96. Thakkar, R. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Global Cerebral Ischemia and Regulation by 17 β -Estradiol. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 8309031 (2016).
97. Cheng, C. *et al.* Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation

of NLRP3 in mice. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20181117 (2019).

98. Stienstra, R. *et al.* The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* **12**, 593–605 (2010).

99. Wen, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* **12**, 408–415 (2011).

100. Stranahan, A. M. *et al.* Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* **18**, 1085–1088 (2008).

101. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* **278**, 45777–45784 (2003).

102. Luo, Y. & Lin, H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Immun. Inflamm. Dis.* **9**, 59–73 (2020).

103. Zatterale, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front. Physiol.* **10**, (2020).

104. Bosetti, F. & Choi, S.-H. Rethinking the role of cyclooxygenase-1 in neuroinflammation: More than homeostasis. *Cell Cycle* **9**, 2919–2920 (2010).

105. Lau, B. K. *et al.* Obesity-induced astrocyte dysfunction impairs heterosynaptic plasticity in the orbitofrontal cortex. *Cell Rep.* **36**, 109563 (2021).

106. Qu, H.-Q., Li, Q., Rentfro, A. R., Fisher-Hoch, S. P. & McCormick, J. B. The Definition of Insulin Resistance Using HOMA-IR for Americans of Mexican Descent Using Machine Learning. *PLoS ONE* **6**, e21041 (2011).