

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS SATURADOS EN LA
AUTOFAGIA Y EN LA FUNCIÓN CELULAR DE LA LÍNEA DE
NEURONAS HIPOTALÁMICAS N43/5.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CARLA MARIA NARRO MERCADO

LIMA - PERÚ

2019

ASESORAS

Dra. Carla Gallo – Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dra. Eugenia Morselli – Pontificia Universidad Católica de Chile

JURADO CALIFICADOR

Presidente: Dr. Jorge Arévalo

Vocal: Dra. Manuela Verástegui

Secretaria: Dra. Cristina Guerra

Agradecimientos

A la Dra. Eugenia Morselli, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su paciencia y guía durante el desarrollo de la tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Autofagia y Metabolismo, por sus consejos, su ayuda y por compartir todos sus conocimientos los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres, por su cariño y apoyo durante toda mi carrera.

Resumen

La autofagia es un proceso homeostático fundamental para degradar y reciclar los componentes celulares. Este proceso tiene un rol crítico, ya que su desregulación contribuye al desarrollo de diversas enfermedades y, entre ellas, la obesidad. Estudios previos *in vitro* e *in vivo* muestran que la inhibición de la autofagia en neuronas hipotalámicas promueve además de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, disminución de la señalización de insulina y de los niveles transcripcionales de *Pomc* (pro-opiomelanocortina) en el hipotálamo. Además, hemos observado que en ratones alimentados crónicamente con una dieta alta en grasa y en cultivos de neuronas hipotalámicas expuestos a ácido palmítico, el flujo autofágico se encuentra bloqueado y la sensibilidad a insulina se encuentra disminuida. Estos hallazgos muestran evidencia de que la autofagia en las neuronas hipotalámicas cumpliría un rol importante para mantener el balance energético.

Siendo el ácido palmítico y el ácido esteárico, dos de los ácidos grasos saturados que aumentan de forma significativa en el cerebro de ratones alimentados con una dieta alta en grasas, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar en la línea celular de neuronas hipotalámicas de ratón N43/5 si los ácidos grasos saturados, palmítico (C 16:0) y esteárico (C 18:0), tienen efectos similares en la autofagia y en funciones características de neuronas hipotalámicas tales como la señalización de insulina y transcripción del péptido anorexigénico *Pomc*. Los resultados indicaron que ambos ácidos grasos saturados inhiben el flujo autofágico y disminuyen la sensibilidad a insulina en la línea celular N43/5. Además, el tratamiento con ácido palmítico, pero no con el ácido esteárico, disminuyó los niveles de mRNA de *Pomc*.

En conclusión, los ácidos grasos saturados inhiben la autofagia y disminuyen la señalización de insulina en las células N43/5. Además, la inhibición de la autofagia a través del silenciamiento de *Atg7* y *Becn1* también disminuyó la sensibilidad a la insulina, lo cual sugiere que el proceso de autofagia es necesario para que la vía de señalización de insulina hipotalámica ocurra de manera adecuada. Por lo tanto, el efecto de los ácidos grasos en la señalización de la insulina podría ser a través de la inhibición del flujo

autofágico. Por último, el ácido palmítico y el ácido esteárico tienen efectos distintos en la regulación de *Pomc*. En este punto, sin embargo, son necesarios más estudios para comprender los distintos mecanismos moleculares que justificarían esta diferencia en la regulación de *Pomc*.

Palabras clave: *autofagia, obesidad, pro-opiomelanocortina (Pomc), insulina, ácido palmítico, ácido esteárico.*

Índice

1. Introducción	7
1.1. La dieta alta en grasas incrementa los niveles de ácidos grasos saturados en el cerebro.	7
1.2. Las dietas altas en grasas afectan la cascada de señalización de insulina y los niveles de mRNA de <i>Pomc</i> en el hipotálamo.	8
1.3. Las dietas altas en grasas (HFD) alteran el proceso de autofagia hipotalámica.	9
1.4. La autofagia es necesaria para la función fisiológica de las neuronas hipotalámicas en el control del balance energético.	11
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivo general.....	14
4. Objetivos Específicos	14
5. Materiales y métodos	15
6. Resultados	20
6.1. El ácido palmítico y el ácido esteárico inhiben el flujo autofágico a 1 y 6 horas de tratamiento en línea celular N43/5.....	20
6.2. El ácido palmítico y el ácido esteárico reducen la sensibilidad a la insulina a las 6 horas de tratamiento en la línea celular N43/5.	25
6.3. El ácido palmítico, pero no el esteárico, disminuye los niveles transcripcionales de <i>Pomc</i> en la línea celular N43/5.	26
6.4. El silenciamiento de <i>Atg7</i> y <i>Becn1</i> reducen la sensibilidad a insulina en la línea celular N43/5.....	27
6.5. El silenciamiento de <i>Atg7</i> , pero no de <i>Becn1</i> , incrementa los niveles transcripcionales de <i>Pomc</i> en la línea celular N43/5.	29
7. Discusión.....	30
8. Conclusiones.....	36
9. Limitaciones y recomendaciones	36
10. Anexos.....	38
11. Bibliografía	42

1. Introducción

1.1. La dieta alta en grasas incrementa los niveles de ácidos grasos saturados en el cerebro.

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por la acumulación excesiva o anormal de triglicéridos en el tejido adiposo cuando la ingesta excede el gasto energético. Por definición las personas obesas son las que tienen un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m² (1). La obesidad es la mayor causante de resistencia a insulina y es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (2). La prevalencia de esta enfermedad casi se ha triplicado entre 1975 y 2016, llegando, en 2016, a más de 650 millones de adultos obesos y, por lo menos 2.8 millones de personas a nivel mundial mueren cada año por causa del sobrepeso u obesidad (1). También en Perú la incidencia de obesidad ha ido aumentando y en el 2017, el 21,0 % de personas mayores de 15 años presentaron obesidad (3).

Uno de los principales factores que han incrementado las tasas de obesidad en las últimas décadas es el consumo de dietas altas en grasa y ricas en ácidos grasos saturados (4,5). En personas obesas se observa un incremento significativo de estos ácidos grasos en el plasma (6) y estudios en ratones indican que estos se acumulan en el cerebro después de una dieta alta en grasas (HFD) (7–10). Específicamente, el ácido palmítico (PA, C16:0) y el ácido esteárico (SA, C18:0) son los ácidos más frecuentes en los fosfolípidos de las membranas celulares y son los dos ácidos grasos saturados que se encuentran en mayor concentración en el cerebro (10). Además, estudios previos de nuestro y otros laboratorios han demostrado que PA y SA incrementan significativamente en el cerebro, y específicamente en el hipotálamo, de roedores macho después del consumo de una dieta alta en grasas, mientras que permanecen sin cambio en las hembras alimentadas con la misma dieta (10–12). Este incremento de ácidos grasos saturados en el hipotálamo podría causar alteraciones en el sistema de regulación de la ingesta y por lo tanto estar asociada al desarrollo de la obesidad.

1.2. Las dietas altas en grasas afectan la cascada de señalización de insulina y los niveles de mRNA de *Pomc* en el hipotálamo.

El hipotálamo es la principal área del sistema nervioso central que se encarga de la regulación del balance energético, de la ingesta de alimentos, de la sensibilidad periférica a la insulina y de la homeostasis de la glucosa (13). En el hipotálamo mediobasal se encuentra el núcleo arcuato y, dentro de este núcleo, dos poblaciones de neuronas de primer orden se encargan de integrar las señales hormonales y nutricionales de la periferia para generar respuestas que mantengan el balance energético. Las neuronas del péptido relacionado al Agouti (AgRP) constituyen el nodo orexigénico y liberan AgRP para promover la ingesta de alimentos; mientras que las neuronas de pro-opiomelanocortina (POMC) constituyen el nodo anorexigénico y expresan el gen *Pomc* el cual es el precursor de múltiples péptidos bioactivos; entre ellos, la hormona estimulante de melanocito- α (α -MSH), la cual inhibe la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético (14,15). La insulina actúa de manera específica en ambos grupos neuronales para modular la homeostasis energética y la producción y utilización de glucosa en los órganos periféricos. Esta acción se da a través de la unión de la insulina a sus receptores en las neuronas POMC y AgRP, activando varias vías de señalización, entre estas, la vía de señalización de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K), que río abajo regula eventos transcripcionales que incrementan la expresión del gen *Pomc* y disminuyen la de *Agrp* con la finalidad de aumentar el tono anorexigénico (14).

Se ha determinado que el consumo de dietas altas en grasas (HFD) reduce la capacidad de la insulina para desencadenar esta cascada de señalización río abajo. En ratas alimentadas con HFD se observó que la administración intraventricular de insulina no generaba el efecto de reducción de la ingesta de alimentos y este evento estaba asociado a una disminución en la fosforilación de AKT en el hipotálamo frente al estímulo de insulina (16–18). Además, estudios previos indican que el tratamiento *in vitro*, en líneas celulares hipotalámicas, e *in vivo* en ratones inyectados intracerebralmente con ácido palmítico promueve resistencia a la insulina (11,19). Si

este efecto es específico del ácido palmítico o es un efecto característico de los ácidos grasos saturados, aún no se sabe.

Las neuronas POMC tienen un rol importante promoviendo el gasto energético y previniendo la deposición excesiva de tejido adiposo. En estudios en roedores con obesidad inducida por consumo de HFD, se observó la disminución de los niveles de mRNA de *Pomc* (20,21) y del número de neuronas inmunoreactivas para α -MSH (22) respecto a los ratones alimentados con la dieta control. Esta disminución de α -MSH y de los niveles de mRNA de *Pomc* en respuesta a una HFD podría ser responsable del aumento de la ingesta, resultando en obesidad (20,22).

Por lo tanto, lo descrito anteriormente evidencia que las HFD podrían promover la obesidad no solo por el exceso de calorías, sino también por los cambios que producen en los mecanismos neuronales que controlan la homeostasis energética de todo el cuerpo. En este contexto, resulta relevante estudiar *in vitro*, el efecto de los ácidos grasos saturados en las funciones características de las neuronas hipotalámicas tales como la respuesta a insulina y la transcripción de *Pomc*.

1.3. Las dietas altas en grasas (HFD) alteran el proceso de autofagia hipotalámica.

La macroautofagia (referido como “autofagia” más adelante) es un proceso homeostático presente en todas las células eucariotas, fundamental para degradar y reciclar los componentes celulares. Para que este proceso ocurra son necesarias varias proteínas ATG (“autophagy-related”), como ATG3, ATG5, ATG7, ATG10 y ATG12, que regulan etapas de formación (iniciación, nucleación, elongación) y cierre de la nueva vesícula autofágica. Cuando la autofagia se induce (iniciación), el complejo ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1), ATG9 (autophagy-related protein 9) y el complejo BECLIN-1 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) son necesarios para formar la estructura precursora de la membrana autofagosomal (23), la cual continúa su elongación para encerrar los componentes citoplasmáticos que tienen que ser degradados (24). Finalmente, la membrana se cierra y forma el autofagosoma, el cual se fusiona con el

lisosoma para formar el autolisosoma, donde el contenido es degradado por las enzimas lisosomales y las nuevas macromoléculas generadas son recicladas en el citoplasma (25). Todo este proceso se define como flujo autofágico, término que comprende los eventos celulares desde la formación del autofagosoma hasta su degradación lisosomal (26).

Existen dos términos para referirse a las alteraciones de la autofagia: inhibición de la autofagia y bloqueo del flujo autofágico. La inhibición de la autofagia ocurre tras una alteración en las etapas tempranas que impide la formación de autofagosomas. Por otro lado, el bloqueo del flujo autofágico ocurre en etapas posteriores a la formación de los autofagosomas; por ejemplo, cuando el contenido no puede ser degradado debido a que las enzimas lisosomales pierden su actividad hidrolítica o no hay fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (27).

El flujo autofágico puede ser evaluado a través de la conversión de LC3I a LC3II y/o cuantificando los niveles de p62. Cuando la autofagia se encuentra en niveles basales, la mayor parte de LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) se encuentra soluble en el citoplasma en la forma LC3I. Si la autofagia es inducida y el flujo autofágico va avanzando, una fracción de LC3I pasa a la forma lipídica LC3II a través de la conjugación con fosfatidiletanolamina y se une a la membrana autofagosmal. Por lo tanto, el aumento de la conversión de LC3I a LC3II es un indicador de formación de vesículas autofágicas. Sin embargo, si el flujo autofágico es interrumpido, por ejemplo, en un escenario donde ocurre un bloqueo de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, los niveles de LC3II también estarán aumentados debido a la acumulación de vesículas autofágicas incapaces de degradar el cargo. Para determinar si el aumento de vesículas autofágicas se debe a la inducción de la autofagia o a un bloqueo del flujo autofágico, se analiza un segundo marcador: p62 (también conocido como sequestosome1 –SQSTM1–), el cual es una proteína adaptadora que interactúa con LC3II y que se encarga de reclutar el cargo citoplasmático (28). p62 se degrada específicamente por autofagia (27), por lo tanto, la inducción de autofagia se refleja por una degradación de p62, mientras que el bloqueo del flujo autofágico es reflejado por la acumulación de la misma proteína.

En roedores, la dieta alta en grasas causa una disfunción hipotalámica que incluye la disminución de la autofagia y/o la inhibición del flujo autofágico (29,30). Estos datos sugieren que la obesidad y el aumento de ácidos grasos saturados en el cerebro están asociados al daño hipotalámico en el cual la autofagia podría cumplir un rol importante (31). Los eventos que llevan a la disfunción autofágica en el hipotálamo no han sido todavía dilucidados.

En humanos obesos y en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa se han reportado alteraciones en la autofagia (disminuida o aumentada dependiendo del tejido en estudio) en órganos metabólicamente activos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (32). Experimentos en roedores alimentados crónicamente con una dieta alta en grasa indican que la autofagia se encuentra alterada en el hipotálamo (8,29): los estudios de los equipos de Portovedo e Ignacio-Souza, indican que la autofagia se encuentra disminuida (29,33), mientras que estudios previos de nuestro laboratorio (Laboratorio de Autofagia y Metabolismo-UC) sugieren que el flujo autofágico sería bloqueado después de alimentación crónica con una dieta alta en grasas. Además, Thaler y colaboradores mostraron que después de una alimentación crónica con una dieta alta en grasas, el número de vesículas autofágicas se encontraba aumentado específicamente en neuronas POMC (31). Esto indica un efecto específico de la dieta en este tipo neuronal, si este aumento de vesículas autofágicas (autofagosomas) es debido a un aumento o bloqueo del flujo autofágico todavía es desconocido.

1.4. La autofagia es necesaria para la función fisiológica de las neuronas hipotalámicas en el control del balance energético.

Estudios en ratones *knock-down* para el gen esencial de autofagia *Atg7* en el hipotálamo medio basal (30) y *knock-out* para el mismo gen en neuronas POMC, indican que la inhibición de la autofagia está asociada al desarrollo de la obesidad debido al aumento de la ingesta de alimentos y a la disminución de la lipólisis. Además estos animales presentan menor tolerancia a la glucosa y un aumento en los niveles plasmáticos de

insulina (23,34,35). Los efectos de disminución en la tolerancia a la glucosa y aumento de los niveles de insulina en el plasma podrían ser secundarios al aumento de peso de los animales y, aún no se ha descrito si la inhibición de la autofagia en neuronas hipotalámicas podría alterar de forma directa la vía de señalización de insulina hipotalámica.

Por otro lado, en un estudio en ratones sometidos a HFD, el *knock-out* del gen *Atg12* en neuronas POMC ocasionó la reducción de los niveles de mRNA de *Pomc* asociado al aumento de la ingesta y a un incremento exacerbado del peso inducido por la dieta (36). Estos resultados sugieren que la autofagia regula la expresión de *Pomc* y, por ende, la función anorexigénica de las neuronas, lo cual podría explicar los efectos observados después del *knock-out* de los genes esenciales de autofagia.

Finalmente, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que ratones macho alimentados con una dieta alta en grasas de forma crónica presentan, además de obesidad e intolerancia a la glucosa, cantidades elevadas de ácido palmítico y ácido esteárico a nivel cerebral (9,10). Además, resultados de nuestro laboratorio indican que en la línea celular de neuronas hipotalámicas de ratón N43/5 (37) y en cultivo primario de neuronas del hipotálamo de ratones, el ácido palmítico inhibe el flujo autofágico. De forma interesante, estudios previos también indican que el tratamiento *in vitro*, en distintos tipos celulares, e *in vivo* en ratones inyectados intracerebralmente con ácido palmítico promueve resistencia a la insulina (11,37,38). Si esta resistencia a la insulina es debida a la inhibición de la autofagia a nivel de las neuronas hipotalámicas y como esto afecta los niveles de péptidos anorexigénicos hipotalámicos aún no está descrito y fue parte de este proyecto de tesis.

En conclusión, este trabajo tuvo como objetivo evaluar si el ácido palmítico y esteárico tienen efectos similares en la autofagia y si estos afectan funciones importantes de las neuronas hipotalámicas para mantener el balance energético y evitar el desarrollo de la obesidad. Con respecto a este último punto, como “read-out” de la función neuronal se evaluó la respuesta a insulina y los niveles transcripcionales del péptido anorexigénico

POMC en el modelo celular de neuronas hipotalámicas de ratón N43/5. Por último, también se evaluó el efecto de la inhibición de la autofagia, mediante el silenciamiento de genes esenciales de autofagia, en la vía de señalización de insulina y los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular propuesta.

Cabe resaltar que algunos experimentos realizados para este proyecto de tesis también fueron parte del artículo de científico: “Palmitic Acid Reduces the Autophagy Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5” (37).

2. Hipótesis

El ácido palmítico y el ácido esteárico bloquean el flujo autofágico, reducen la respuesta a insulina y los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular hipotalámica de ratón N43/5.

3. Objetivo general

Evaluar el efecto del ácido palmítico y el ácido esteárico sobre el flujo autofágico, sobre la respuesta a insulina y sobre los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular hipotalámica de ratón N43/5.

4. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del ácido palmítico y el ácido esteárico sobre el flujo autofágico en la línea celular hipotalámica N43/5.
2. Evaluar el efecto del ácido palmítico y el ácido esteárico sobre la fosforilación de AKT inducida por insulina en la línea celular hipotalámica N43/5.
3. Evaluar el efecto del ácido palmítico y el ácido esteárico sobre los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular hipotalámica N43/5.
4. Evaluar el efecto de la inhibición de la autofagia, mediante el silenciamiento de genes esenciales de autofagia, sobre la fosforilación de AKT inducida por insulina y sobre los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular hipotalámica N43/5.

5. Materiales y métodos

5.1. Cultivo celular

Los experimentos fueron realizados en la línea celular de ratón N43/5 (Cellutions Biosystems, USA), la cual es considerada como un modelo de neuronas hipotalámicas POMC (39,40).

Las células N43/5 se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5%, en medio DMEM alto en glucosa (4.5 g/l) (11995-040, Gibco, USA) suplementado con FBS (10437028, Gibco, USA) al 10% y 100 U/ml penicilina estreptomina (15140122, Gibco, USA).

5.2. Tratamientos Celulares

En todos los experimentos, el tratamiento con BSA (vehículo) (152401, MP Biomedicals, USA) fue usado como control. Las células fueron tratadas con 100 µM de ácido palmítico o esteárico (Sigma-Aldrich, USA) conjugados con BSA. Estas concentraciones de ácidos grasos son similares a las encontradas en el cerebro de ratones obesos alimentados por cuatro meses con dieta alta en grasas (7). El efecto de estos ácidos grasos sobre la autofagia se evaluó después de 6 horas de tratamiento, tiempo al cual, según datos previos del laboratorio, el flujo autofágico está significativamente reducido en células tratadas con ácido palmítico. Para evaluar si los ácidos grasos tenían un efecto similar sobre la autofagia a tiempos más cortos, adicionalmente se realizaron experimentos a 1 hora de tratamiento. Las células fueron co-tratadas con el inhibidor clásico del flujo autofágico Bafilomicina A1 (BafA1, 100 nM) (B1793, Sigma-Aldrich, USA), o con su vehículo DMSO (BM-0660, Winkler, Chile).

Para evaluar el efecto sobre los niveles de *Pomc* las células fueron tratadas por 6 horas con BSA y ácido palmítico o esteárico (100 µM).

Por último, para ver el efecto de los ácidos grasos sobre la cascada de señalización de insulina, las células fueron tratadas con BSA, ácido palmítico o ácido esteárico por 6 horas y después tratadas con insulina (1 nM) (I0516, Sigma-Aldrich, USA) por 15 minutos.

5.3. Evaluación de la autofagia y flujo autofágico

La presencia de vesículas autofágicas fue evaluada por inmunofluorescencia usando anticuerpos para LC3. Con esta técnica también se evaluó p62. Mediante Western Blot, se evaluó la conversión de LC3I a LC3II y los niveles de p62.

Para determinar si el aumento de LC3II y p62 se debe al aumento de la autofagia o a la acumulación de vesículas autofágicas incapaces de degradar el cargo, se comparó el efecto de los ácidos grasos con el efecto de la Bafilomicina A1 (Baf A1, 100 nM), un inhibidor químico de la bomba de protones (V-ATPasa), que es usado frecuentemente para bloquear el flujo autofágico, evitando la acidificación del lisosoma, lo cual impide la degradación del material intra-vesicular y ocasiona la acumulación de vesículas autofágicas.

5.4. Western Blot

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y fueron mantenidas hasta alcanzar un 80% de confluencia. Después de los tratamientos, las células se lisaron con tampón RIPA más inhibidores de fosfatasas/proteasas (Merck Millipore, USA) y de cada muestra, 30-40 µg de proteínas desnaturalizadas se separaron en SDS-PAGE al 8%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con 5% de BSA (BM-0150, Winkler, Chile) -buffer tris salino- Tween 20 0.1% (TBS-T) para bloquear las uniones no específicas de los anticuerpos a utilizar posteriormente. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche sobre un agitador a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron en buffer tris salino con Tween 0.1% (TBS-T) y fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se revelaron con el substrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (34580, Thermofisher, USA). La densitometría de las bandas fue cuantificada mediante el programa ImageJ (National Institute of Health, USA).

Para evaluar el flujo autofágico se usaron los anticuerpos primarios anti-LC3 I/II (1:1000, 4108, Cell Signaling Technology, USA) y anti-p62 (1:3000, H00008878-M01, Abnova,

Taiwan). Debido a que la insulina activa la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en el hipotálamo y que los defectos en la transducción de esta vía están implicados en la resistencia a la insulina en la obesidad y diabetes (8, 26), se usaron los anticuerpos anti-AKT (1:1000, 9272, Cell Signaling Technology, USA) y anti-pAKT (Ser473) (1:1000, 9271, Cell Signaling Technology, USA) para evaluar la señalización de insulina. Se evaluó β -actina (1:10 000, A1978, Sigma-Aldrich, USA) como control de carga. Se usaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate, 1706516; Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate, 1706515; Bio-Rad, USA).

Con respecto a los experimentos para evaluar el flujo autofágico, se calcularon los ratios LC3II/(LC3I+LC3II) y p62/actina. Estos datos fueron normalizados respecto al control (BSA) a 1 h de tratamiento. Para evaluar la señalización de insulina, muestras iguales fueron separadas y corridas en dos geles paralelos, uno para evaluar AKT y otro para p-AKT. Los ratios p-AKT/AKT presentados en las gráficas fueron calculados a partir de AKT/actina y p-AKT/actina. Estos datos fueron normalizados respecto al control (BSA).

5.5. PCR en tiempo real (qPCR)

El RNA fue extraído del cultivo celular N43/5, usando el kit E.Z.N.A total RNA (Omega bio-tek, USA). El cDNA fue sintetizado usando el kit iScript™ cDNA (Bio-Rad, USA) a partir de 1 μ g de RNA. Las reacciones de PCR cuantitativo fueron conducidas por Step One System Real Time PCR (Applied Biosystems, USA) para evaluar los niveles relativos de *Pomc*. *Hprt* fue usado como housekeeping. Para los análisis de cuantificación relativa se utilizó el método $\Delta\Delta CT$.

El “forward primer” usado para el gen *Hprt* fue AAGCCTAAGATGAGCGCAAG y el “reverse primer” fue TTACTAGGCAGATGGCCACA. Mientras que para el gen *Pomc*, el “forward primer” usado fue CTGGAGACGCCCGTGTTTC y el “reverse primer” fue TGGACTCGGCTCTGGACTG.

5.6. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio puestos previamente en placas de 24 pocillos, y fueron mantenidas hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego de los tratamientos con BSA y ácidos grasos, las células fueron fijadas con metanol durante 10 mín., bloqueadas con 3 % BSA, PBS durante 1 hora y luego incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios para LC3 I/II (1:250; Cell Signaling Technology, USA) y p62 (1:300; Abnova, Taiwan). Al día siguiente, las células fueron incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (1:300; Alexa Fluor, Life Technologies) durante 1h a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti, Japón).

En la célula, LC3 I tiene un patrón difuso en el citosol y cuando la autofagia es activada, LC3 I pasa a la forma LC3 II, la cual se une a la membrana de los autofagosomas y se acumula en estas vesículas autofágicas. Como consecuencia, LC3 II se caracteriza por presentar un patrón punteado o estructuras redondas también llamadas “dots” (27). Con respecto a p62, la inhibición de la autofagia está correlacionada con la acumulación de p62 en la célula, lo cual se evidencia por la formación de agregados o “dots” de esta proteína (27). El número de dots de LC3 II o p62 por célula fue obtenido calculando el promedio de los dots de al menos 100 células por cada experimento. El promedio de cada tratamiento fue normalizado respecto al control (BSA). La cuantificación de dots se realizó con el programa Confocal Uniovi Image J (NIH, USA).

5.7. Silenciamiento de genes

La importancia de la autofagia para el control hipotalámico del balance energético ha sido establecida usualmente en roedores *Knockout* y *knockdown* para el gen esencial de autofagia *Atg7* en el hipotálamo mediobasal (30) y neuronas POMC (34,35,41). La inhibición de la autofagia en estos ratones promueve significativamente el aumento de peso debido a un aumento en la ingesta de alimentos, acompañado de desórdenes metabólicos como intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (30,34,41). Debido a lo observado *in vivo*, se decidió realizar el silenciamiento del gen *Atg7* y adicionalmente se

silenció un segundo gen esencial de autofagia, *Becn1*, con el fin de corroborar que los efectos de la inhibición de la autofagia no son específicos del gen que se está silenciando, y que son debidos a la inhibición del proceso autofágico.

ATG7 o BECLIN-1 (*Becn1*) fueron silenciados usando siRNAs específicos contra las proteínas de interés (SASI_Mm01_00044616 y SASI_Mm01_00048143, respectivamente; Sigma-Aldrich, USA). La transfección se realizó usando Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones de manufactura. Como control negativo las células fueron tratadas solo con Lipofectamina RNAiMax. 48 hrs luego de la transfección las células fueron estimuladas con insulina o colectadas según corresponda. La eficiencia del silenciamiento fue evaluada por medio de la cuantificación de la proteína de interés por WB y/o por RT-qPCR.

5.8. Análisis Estadístico

Los gráficos de los resultados obtenidos se muestran con la media \pm SEM a partir de al menos tres experimentos independientes. En algunos casos se realizaron más experimentos para reducir la varianza de los datos. Los análisis estadísticos fueron hechos con Microsoft Office Excel 2016 y el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA), empleando ANOVA de dos vías y t de Student o las pruebas equivalentes para datos no paramétricos. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Se usó el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos.

6. Resultados

6.1. El ácido palmítico y el ácido esteárico inhiben el flujo autofágico a 1 y 6 horas de tratamiento en línea celular N43/5.

Para evaluar si el ácido palmítico y el esteárico afectan la autofagia basal en la línea celular hipotalámica N43/5, las células fueron tratadas con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M) y ácido esteárico (100 μ M) en ausencia y presencia de Bafilomicina A1 (BafA1, 100 nM) durante 1 y 6 horas. Como muestra el western blot, en las células con tratamientos durante 1 h, el ácido palmítico y esteárico aumentan significativamente los niveles de LC3 II/(LC3I+LC3II) respecto al control (Figuras 1A y B), lo cual indica que hay un incremento en el número de vesículas autofágicas. Con el tratamiento con BafA1, un inhibidor del flujo que promueve la acumulación de vesículas autofágicas, no se observa el efecto del aumento de los niveles de LC3 II/(LC3I+LC3II) y de p62 cuando las células se exponen a este fármaco por 1 h (Figuras 1A y B). Con respecto a los niveles de p62, no hay diferencias en la densidad de las bandas; no obstante, en las células tratadas con ácido palmítico y esteárico se observa la presencia de una doble banda, lo que sugiere que estos ácidos grasos saturados podrían estar ocasionando una modificación post-traducciona l en p62 (Figura 1A y C).

A las 6 horas de tratamiento, el ácido palmítico y esteárico aumentan significativamente los niveles de LC3 II/(LC3I+LC3II) y p62 con respecto al control (BSA 6 hrs). Estos niveles no aumentaron más en presencia de BafA1 (BSA-BafA1 vs PA-BafA1; BSA-BafA1 vs SA-BafA1; Figura1), sugiriendo que el ácido palmítico y el esteárico bloquean el flujo autofágico.

Para corroborar estos resultados, mediante inmunofluorescencia se analizó el patrón de vesículas autofágicas caracterizadas por la formación de agregados o dots de LC3 y p62. Respecto al control (BSA), los tratamientos con ácido palmítico y esteárico aumentaron el número y tamaño de los dots de LC3 y p62 a 1 y 6 horas de tratamiento (Figura 2; Anexos figura 7). Además, en el ensayo con BafA1, el incremento de dots mediado por la exposición a los dos ácidos grasos no fue mayor respecto al tratamiento con BSA-

BafA1 (Figura 2; Anexos figura 7), confirmando que los ácidos grasos saturados estarían inhibiendo en flujo autofágico.

De acuerdo a estos resultados el incremento de LC3 II y p62, dado por la exposición a ambos ácidos grasos, se debería a una acumulación de vesículas autofágicas incapaces de degradar el cargo y no a una mayor síntesis de autofagosomas. Por lo tanto, se sugiere que el ácido palmítico y el ácido esteárico inhiben el flujo autofágico a partir de la primera hora de exposición a dichos ácidos grasos.

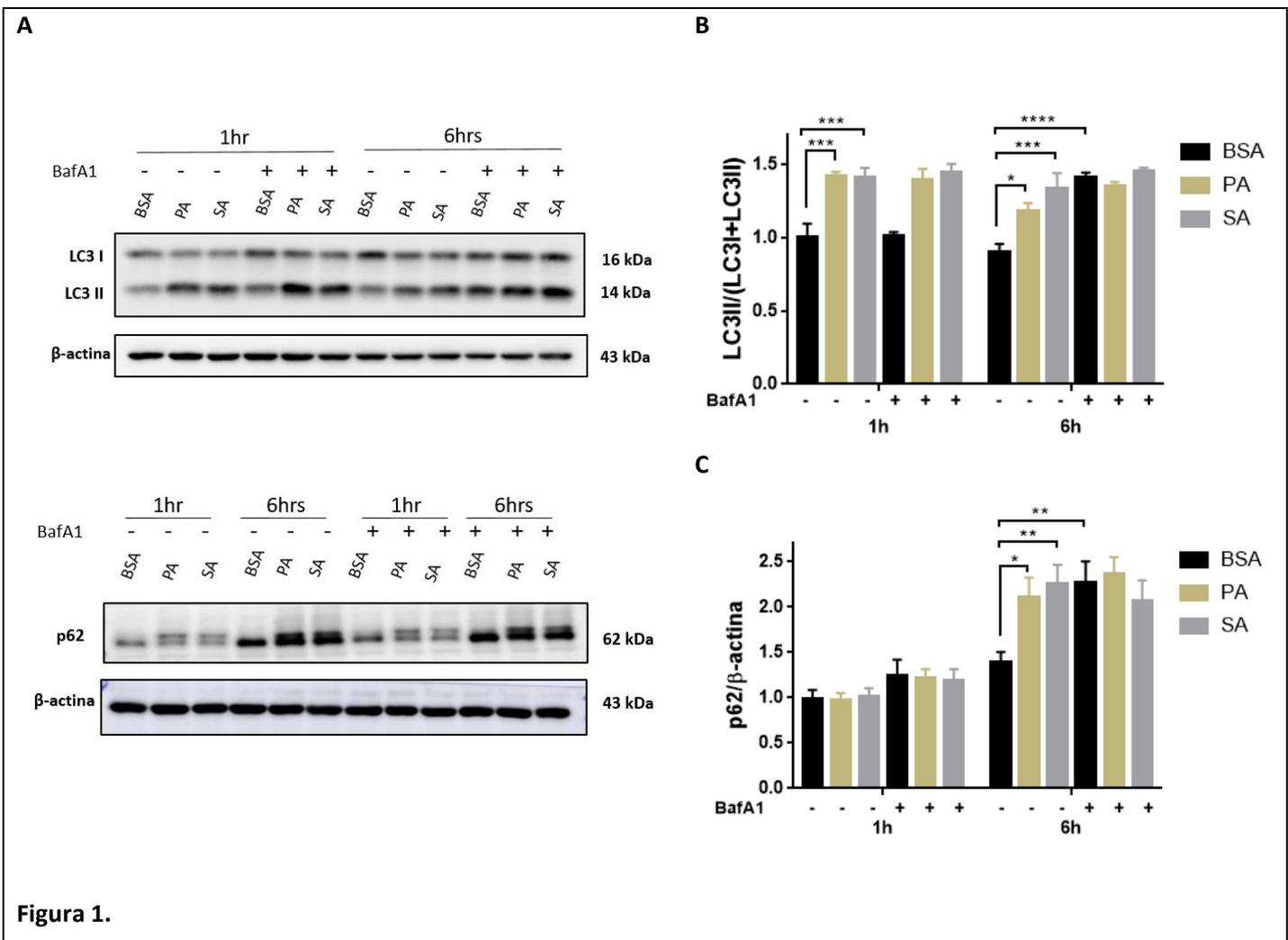
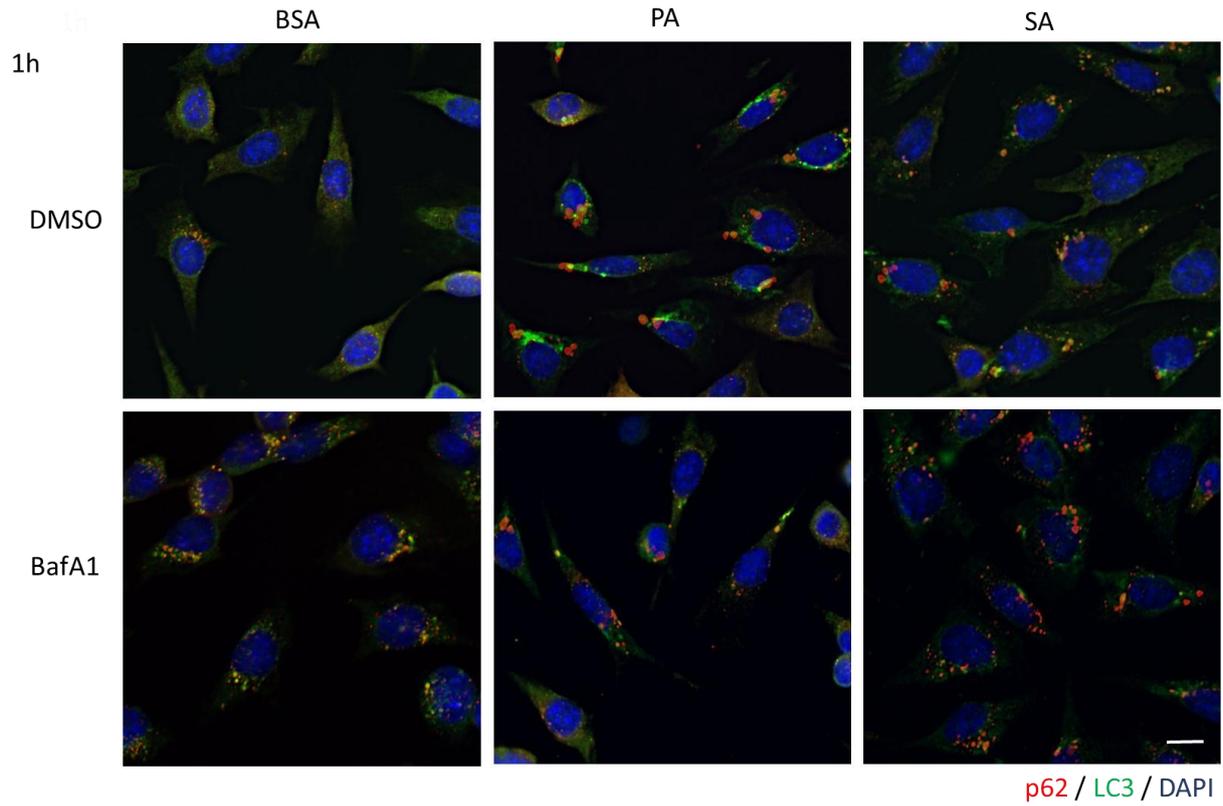
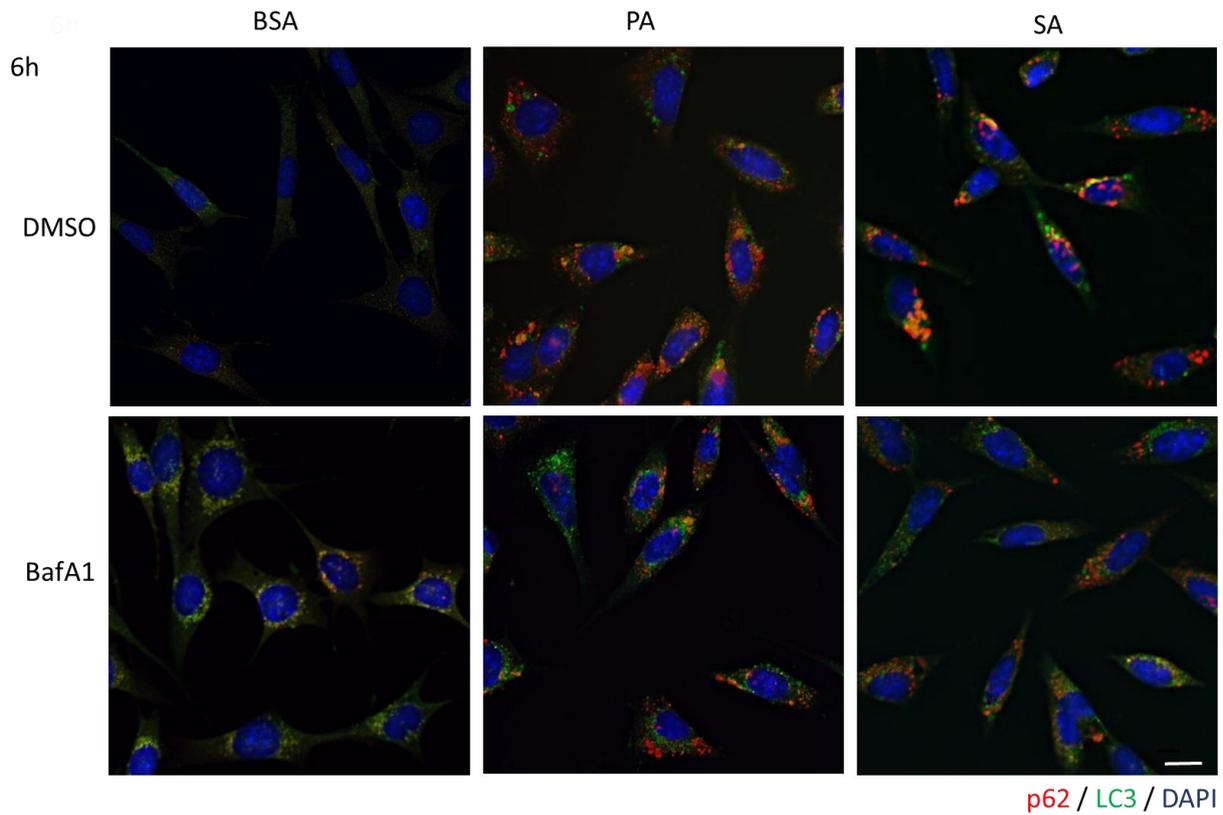


Figura 1.

(A) Western blots representativos del ratio LC3I respecto al total (LC3I +LC3II) y de los niveles de p62 en células N43/5 tratadas durante 1 h y 6 hrs con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M), ácido esteárico (100 μ M) en presencia o ausencia de BafA1 (100 nM), con sus respectivas cuantificaciones **(B, C)**. Los ratios LC3II/(LC3I+LC3II) y p62/ β -actina presentados en las gráficas fueron calculados normalizando los ratios de los tratamientos respecto al control (BSA) a 1 h de tratamiento. Los datos están representados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (B) n=3; (C) n=4.

A**B**

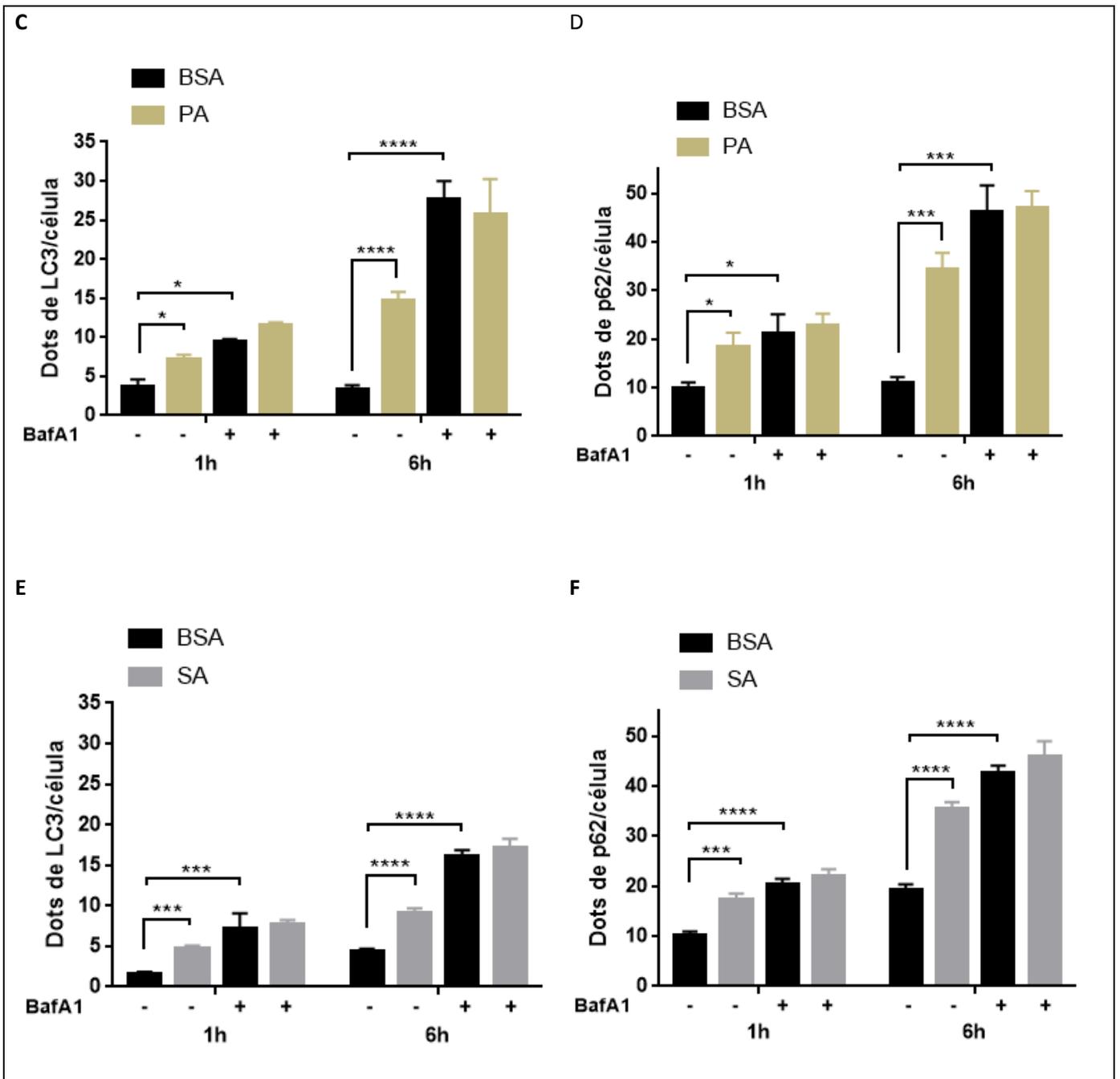


Figura 2.

(A, B) Imágenes representativas de células N43/5 tratadas durante 1 h y 6 hrs con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M), ácido esteárico (100 μ M) en ausencia o presencia de BafA1 (100 nM), marcadas para LC3 (verde) y p62 (rojo). Núcleo marcado con DAPI (azul). Largo de la barra: 10 μ m. Cuantificación de dots de LC3 y p62 por célula, frente al tratamiento con ácido palmítico (C, D) y ácido esteárico (E, F). Los datos están representados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n=3$.

6.2. El ácido palmítico y el ácido esteárico reducen la sensibilidad a la insulina a las 6 horas de tratamiento en la línea celular N43/5.

Para evaluar si el ácido palmítico y el esteárico reducen la sensibilidad a insulina, se determinó la fosforilación de AKT (p-AKT) en la línea celular N43/5 después de la exposición a estos ácidos grasos saturados durante 6 horas. En los controles (BSA), la exposición a insulina durante 15 minutos aumentó significativamente la fosforilación de AKT respecto a los niveles basales, indicando que el modelo celular es sensible a insulina (Figura 3). Por el contrario, el ácido palmítico y el esteárico no ocasionaron la misma respuesta frente a la exposición a insulina (Figura 3).

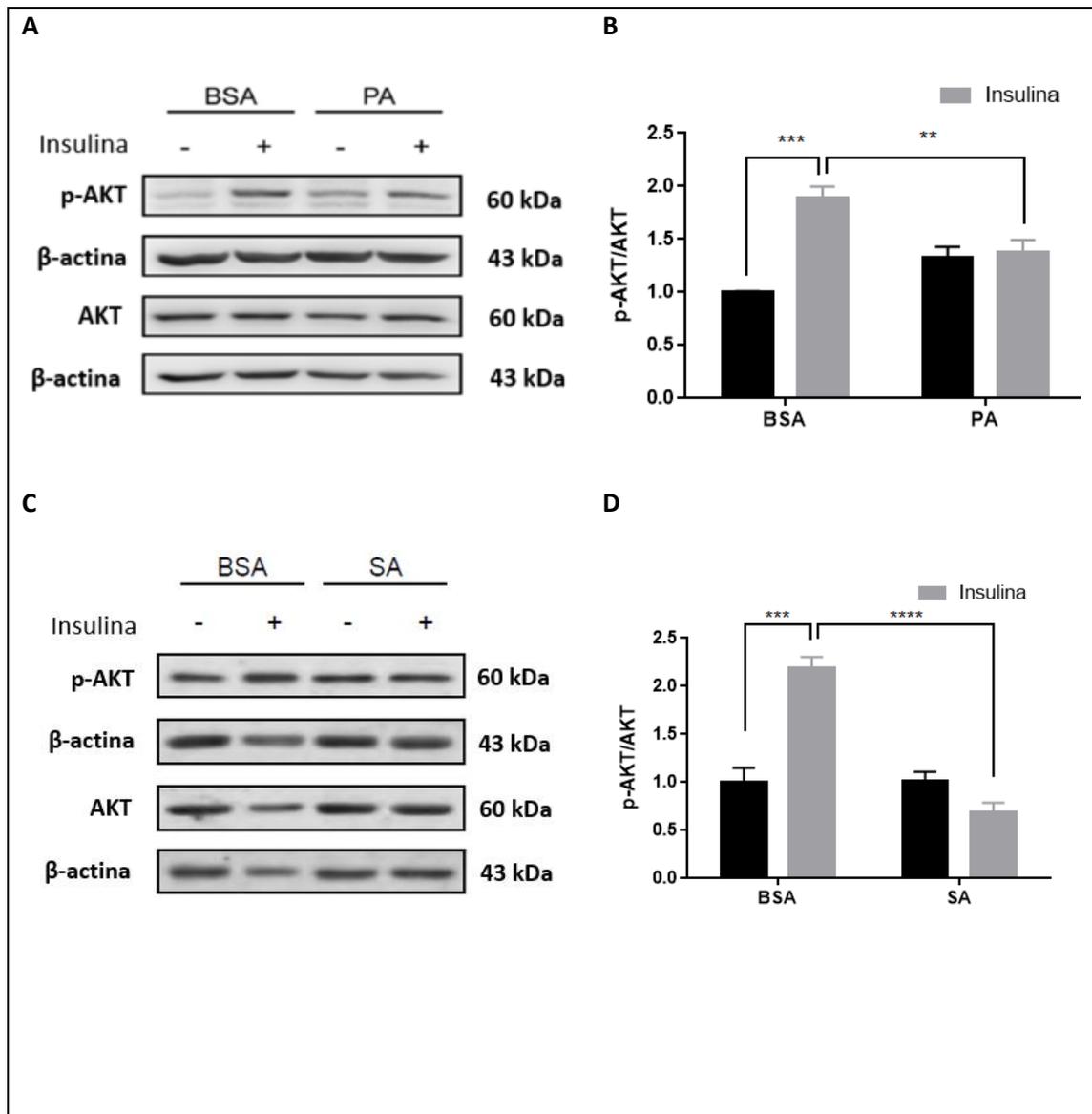


Figura 3.

(A, C) Western blots representativos de los niveles de la fosforilación de AKT (Ser473) en células N43/5 tratadas durante 6 horas con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M), ácido esteárico (100 μ M) con o sin estimulación de insulina durante 15 min; con sus respectivas cuantificaciones **(B, D)**. Los ratios p-AKT/AKT presentados en las gráficas fueron calculados normalizando los ratios de los tratamientos respecto al control (BSA). Los datos están representados como la media \pm SEM. Se realizó ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Sidak. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n=3$.

6.3. El ácido palmítico, pero no el esteárico, disminuye los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular N43/5.

Para elucidar si los ácidos grasos saturados afectan la regulación hipotalámica del balance energético, la aproximación experimental consistió en evaluar si el ácido palmítico y el ácido esteárico afectan los niveles de mRNA de *Pomc*. Para ello, las células fueron tratadas durante 6 horas con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M) y ácido esteárico (100 μ M). El tratamiento durante 6 horas con ácido palmítico redujo los niveles relativos de *Pomc* en un 50 % respecto a las células tratadas con BSA (Figura 4A). Por el contrario, no hubo diferencia en los niveles de *Pomc* entre las células tratadas con el ácido esteárico y el control (Figura 4B).

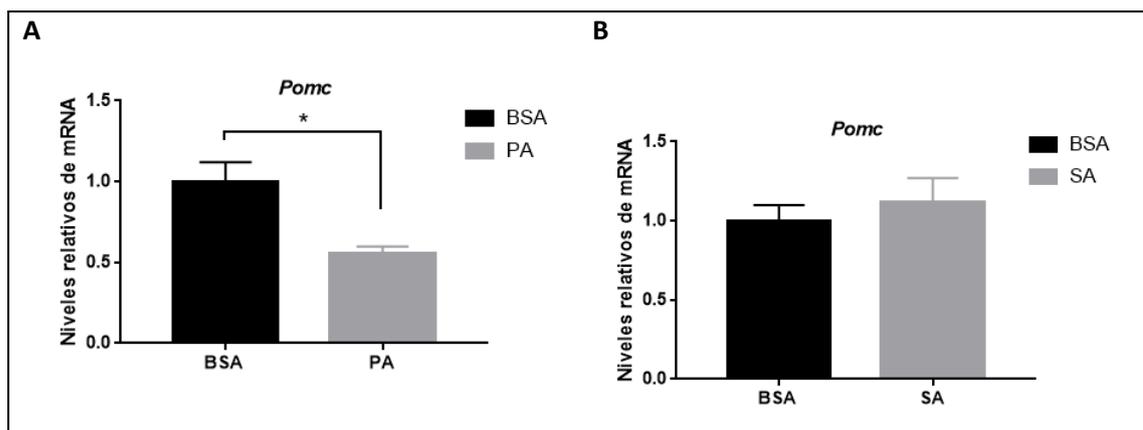


Figura 4.

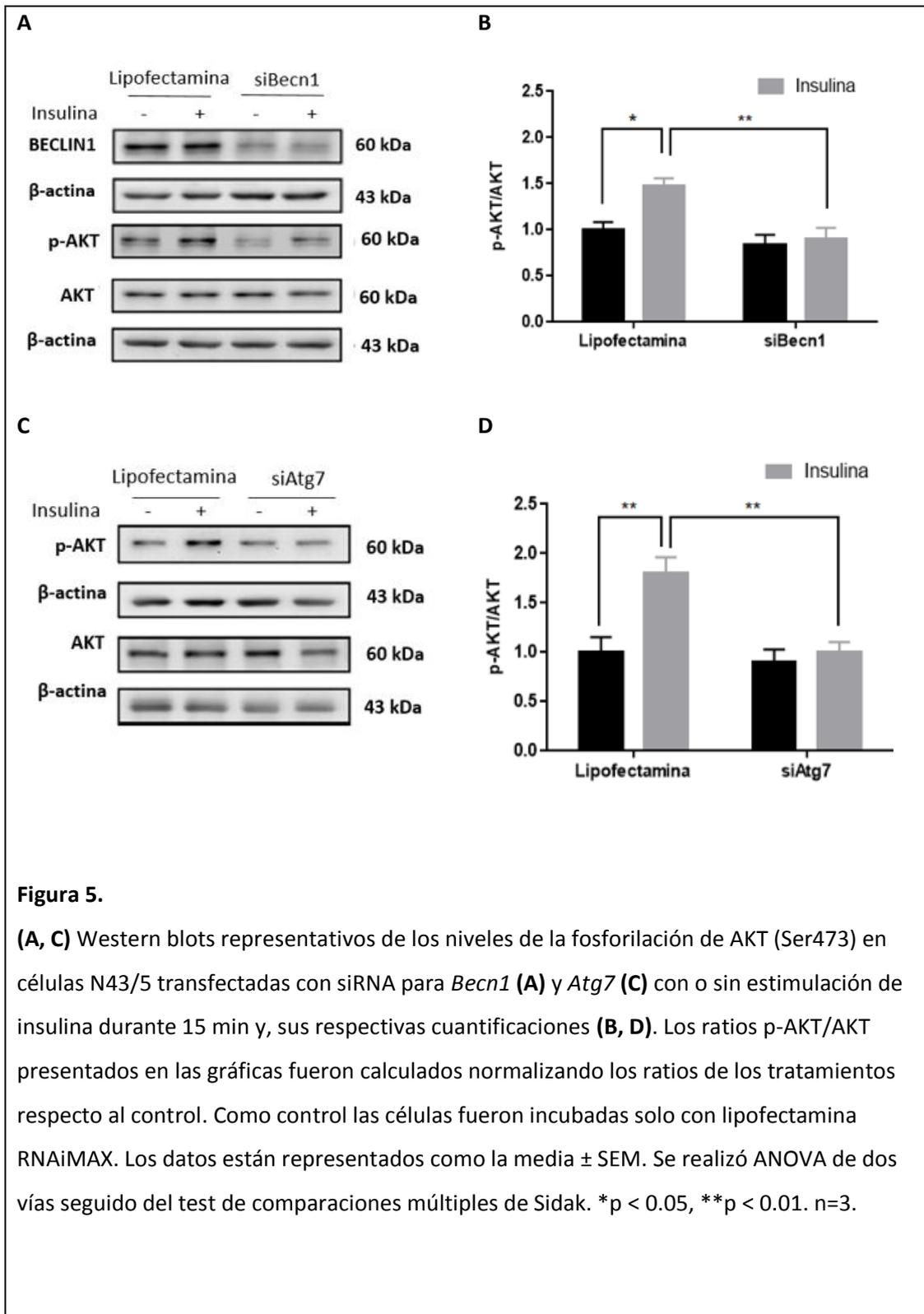
(A, B) Niveles relativos de mRNA de *Pomc* en células N43/5 medidos mediante real-time PCR. Las células fueron tratadas durante 6 horas con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M) y ácido esteárico (100 μ M). Los datos están representados como la media \pm SEM y normalizados respecto al control (BSA). Se aplicó t test para evaluar las diferencias entre tratamientos. * $p < 0.05$. $n=3$.

6.4. El silenciamiento de *Atg7* y *Becn1* reducen la sensibilidad a insulina en la línea celular N43/5.

En los experimentos anteriores se obtuvo que los dos grasos saturados bloquean el flujo autofágico y reducen la sensibilidad de insulina. Para evaluar si la reducción de insulina está mediada por la inhibición de la autofagia, se silenciaron dos genes esenciales de este proceso.

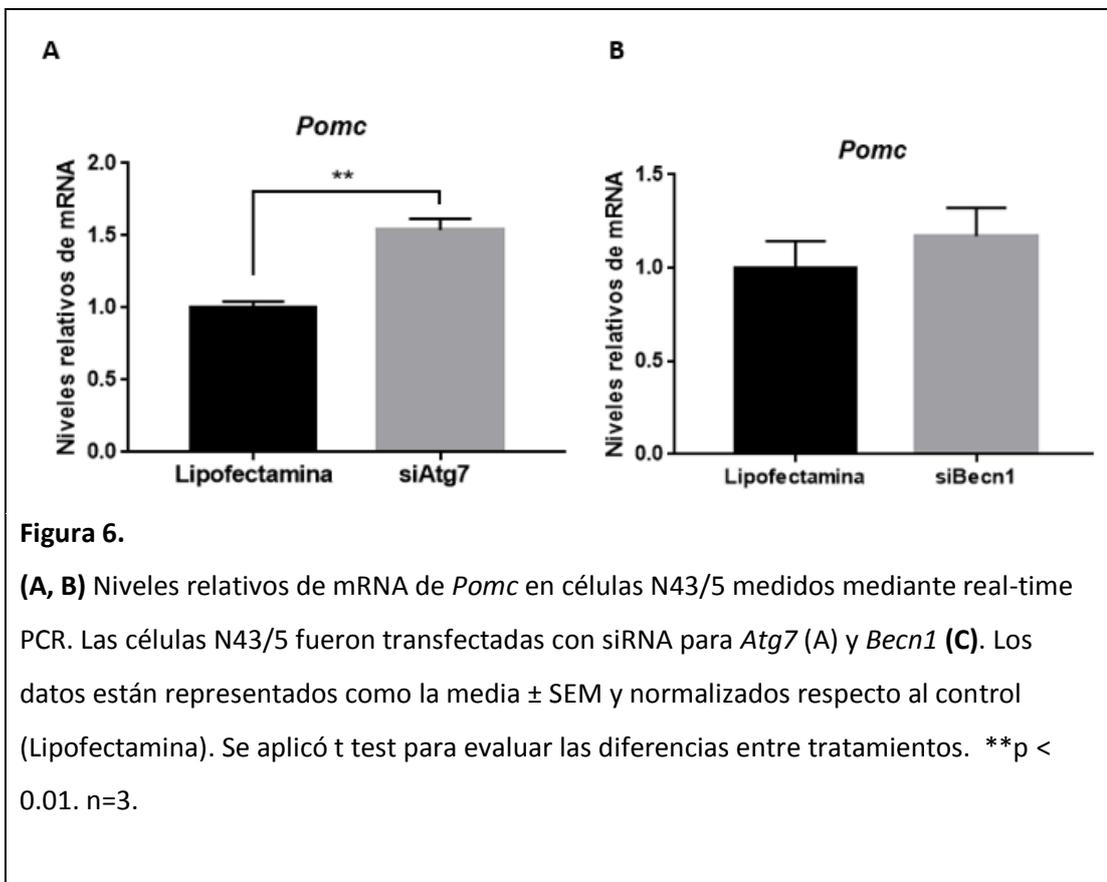
Debido a que los experimentos *in vivo* en ratones muestran que el *knockout* de *Atg7* en el hipotálamo (30) y en las neuronas POMC (34,35,41) promueve significativamente el aumento de peso acompañado de desórdenes metabólicos como intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia; se decidió realizar el silenciamiento del gen *Atg7* (Anexos figura 9) y adicionalmente se silenció un segundo gen esencial de autofagia, *Beclin1* (*Becn1*) (Anexos figura 8) con el fin de corroborar que los efectos no son específicos del gen que se está silenciando y que se deben a la inhibición del proceso autofágico.

Posteriormente se midieron los niveles de p-AKT sin y con estímulo de insulina. En los controles (células tratadas con lipofectamina), la exposición a insulina durante 15 minutos aumentó significativamente la fosforilación de AKT (Figura 5), mientras que este incremento se redujo significativamente bajo el silenciamiento de ambos genes (Figura 5). Por lo tanto, la inhibición de la autofagia, mediante el silenciamiento de *Atg7* y *Becn1*, reducen la sensibilidad a la insulina en células N43/5.



6.5. El silenciamiento de *Atg7*, pero no de *Becn1*, incrementa los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular N43/5.

Para evaluar si la autofagia es fundamental para la regulación hipotalámica del balance energético, se bloqueó la autofagia mediante el silenciamiento de los genes *Atg7* y *Becn1* en las células N43/5 (Anexos figura 8 y 9) y se midieron los niveles relativos de mRNA de *Pomc*. El silenciamiento de *Atg7* aumentó significativamente los niveles transcripcionales de *Pomc* (Figura 6A), mientras que el silenciamiento de *Becn1* no tuvo ningún efecto en los niveles de *Pomc* (Figura 6B).



Nota: Los experimentos realizados para obtener los resultados N^o 1, 2 y 4 también contribuyeron al artículo científico: "Palmitic Acid Reduces the Autophagy Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5".

7. Discusión

El ácido palmítico y el ácido esteárico son dos de los ácidos grasos saturados más abundantes en la dieta (44) y los que aumentan de forma significativa en el cerebro de ratones macho alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) (11,45). Con la finalidad de comprender cuál es el efecto del aumento en la concentración de estos ácidos grasos en la función de las neuronas hipotalámicas, se evaluó específicamente el efecto del ácido palmítico y el ácido esteárico en la autofagia, en la señalización de insulina y en los niveles de mRNA de *Pomc*. Los resultados indican que ambos ácidos grasos saturados inhiben el flujo autofágico y disminuyen la sensibilidad a insulina en la línea celular N43/5. Además, la inhibición de la autofagia a través del silenciamiento de *Atg7* y *Becn1* también disminuyó la sensibilidad a insulina. El tratamiento con ácido palmítico, pero no con el ácido esteárico, disminuyó los niveles de mRNA de *Pomc*. Finalmente, solo el silenciamiento de *Atg7* ocasionó un incremento en los niveles transcripcionales de *Pomc*.

En roedores se ha demostrado que después de ser alimentados con una HFD, la autofagia basal es disfuncional en el hipotálamo (8,29,30,33). Los resultados de esta tesis indican que el ácido palmítico y esteárico bloquearían el flujo autofágico al interrumpir la degradación del cargo (Figura 1 y 2; Anexos figura 7). Adicionalmente, resultados de nuestro equipo de trabajo mostraron que el pretratamiento con el inhibidor del Receptor de Ácidos Grasos Libres 1 (FFAR1), GW1100, previene la inhibición del flujo autofágico en las células N43/5 tratadas con ácido palmítico. Indicando que el ácido palmítico inhibe el flujo autofágico a través de la activación de FFAR1 (37). Aunque es necesario confirmar los datos experimentalmente, se puede especular que el ácido esteárico también podría estar inhibiendo el flujo autofágico a través de la activación de FFAR1, dado que este es un receptor de ácidos grasos de cadena larga, como lo es el ácido palmítico y esteárico.

Además, estos datos concuerdan con lo encontrado en otros tipos celulares: en cultivos de células hepáticas y de riñón, la exposición a ácido palmítico inhibe el flujo autofágico

en etapas posteriores a la formación de los autofagosomas y esto está asociado a una desregulación en la capacidad de degradación lisosomal (46–49). Sin embargo, respecto a los resultados en la línea celular N43/5, se desconoce si los defectos en la capacidad de degradación del cargo, ocasionados por el ácido palmítico y esteárico, son debidos a la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma o a alteraciones en la acidificación lisosomal. Por otro lado, un estudio en células hepáticas demostró que el tratamiento con ácido palmítico está asociado al incremento de Rubicon, un regulador negativo de la fusión autofagosoma-lisosoma (46). Tomando en cuenta lo anterior, el ácido palmítico y esteárico podrían estar involucrados en el incremento de la actividad de proteínas asociadas con la inhibición del flujo autofágico.

La exposición a ácido palmítico y esteárico ocasionó una modificación post-traducciona l en p62 a partir de la primera hora de tratamiento (Figura 1A). En condiciones normales, p62 se oligomeriza para secuestrar el cargo en el autofagosoma y, recientemente, se ha visto que ubiquitinaciones en p62 pueden regular su función celular (50). Asimismo, se han identificado ubiquitina ligasas que, dependiendo del sitio y número de ubiquitinaciones, inhiben o facilitan la actividad de p62 (50). Por ejemplo, en situaciones de estrés celular como estrés oxidativo y acumulación tóxica de ubiquitina, ciertas E3 y E2 ubiquitina ligasas interactúan directamente con p62 y ubiquitinan residuos específicos que impiden la oligomerización de p62 y por ende inhiben la función de secuestrar el cargo (51,52). En base a lo mencionado, existe la posibilidad de que el ácido palmítico y esteárico generen un estrés celular que conlleve a la modificación de p62.

El *crosstalk* entre la autofagia y la sensibilidad a insulina ha sido identificada en órganos periféricos metabólicamente activos. Por ejemplo, en condiciones de resistencia a la insulina, la autofagia está disminuida en el hígado, tejido cardiaco y páncreas (53–56). Mientras que la inhibición de la autofagia a través del *knock-out* (KO) de *Atg7* en el hígado promueve resistencia a insulina en este tejido (57). El consumo de HFD eleva los niveles de insulina, lo cual está asociado a la disminución del proceso de la autofagia hipotalámica (30) y a su vez, la desregulación de la autofagia en las neuronas hipotalámicas contribuye al desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas a la

obesidad, como el incremento de insulina plasmática, hiperglicemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la leptina e insulina (30,42,58,59). Estos datos sugieren que la desregulación de la autofagia podría ser causa y efecto de la obesidad y que la acumulación de los ácidos grasos saturados en el SNC de ratones macho promueve un círculo vicioso donde la inhibición de la autofagia podría aumentar las alteraciones asociadas a la obesidad. En este contexto, los resultados indican que el ácido palmítico, el esteárico y la inhibición de la autofagia mediante el silenciamiento de *Atg7* y *Becn1*, disminuyen la capacidad de las neuronas para responder a la insulina (Figura 3 y 5). Estos datos indican que la inhibición de la autofagia es suficiente para disminuir la sensibilidad a insulina en el modelo de neuronas hipotalámicas N43/5. Más aún, nuestro equipo de trabajo ha demostrado, en la misma línea celular, que el ácido palmítico activa FFAR1 y que la inhibición del flujo autofágico y la reducción de la sensibilidad a la insulina son prevenidas por la inhibición farmacológica de FFAR1 (37). Por lo tanto, es posible que la activación de FFAR1 por el ácido palmítico estaría reduciendo la sensibilidad a la insulina a través de la inhibición del flujo autofágico. Por otro lado, existe la posibilidad de que la inhibición de la autofagia prevenga la degradación de reguladores negativos de la vía de la señalización de insulina, como la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN), la cual puede ser degradada por la vía autofágica-lisosomal (60). La acción de la insulina a nivel central es crítica para regular la homeostasis energética y de glucosa. Basado en los resultados obtenidos, se puede especular que el balance de la autofagia hipotalámica es clave para la regulación de la glucosa periférica.

Estudios en roedores con obesidad inducida por consumo de HFD muestran una disminución de los niveles de mRNA de *Pomc* (20,21,61). Sin embargo, no está claro si los cambios en los niveles transcripcionales de *Pomc* se deben a la HFD o a la obesidad, destacando la importancia de comprender, *in vitro*, los mecanismos celulares que intervienen en el desarrollo de los fenotipos observados *in vivo*. En este contexto, se evaluó en la línea celular hipotalámica N43/5 el efecto del ácido palmítico y ácido esteárico en los niveles de mRNA de *Pomc*. Los resultados indicaron que el tratamiento con ácido palmítico, pero no con esteárico, disminuyó significativamente los niveles de mRNA de *Pomc* (Figura 4). Estos datos demuestran que el ácido palmítico; un

componente de la HFD, que además está asociado con la función anormal de las neuronas hipotalámicas en la obesidad (62) afecta directamente la síntesis de POMC. En presencia de nutrientes, como el ácido palmítico, las neuronas POMC estimulan la producción de POMC para generar α -MSH y generar una respuesta anorexigénica (15). En este contexto, la disminución de *Pomc* observada, podría implicar una respuesta metabólica anormal causada por el ácido palmítico. Sin embargo, es necesario confirmar este supuesto mediante la evaluación de los niveles proteicos de POMC y α -MSH ya que se ha demostrado que la HFD también afecta los niveles de la pre-proteína POMC, de los péptidos derivados de POMC y de la enzima carboxypeptidasa E (CPE) que se encarga del procesamiento de POMC para producir α -MSH (63), que en conjunto desencadenan una respuesta fisiológica final. Cabe resaltar que la exposición a ácido esteárico durante 6 horas no tuvo efecto en los niveles de mRNA de *Pomc* (Figura 4B). Si bien el ácido palmítico y esteárico son ácidos grasos saturados de cadena larga, podrían modular los cambios de *Pomc* mediante mecanismos diferentes o en tiempos distintos. En primera instancia, evaluar los niveles de mRNA de *Pomc* en varios tiempos de exposición a ácido palmítico y esteárico, brindaría indicios de la acción diferencial de ambos ácidos grasos en las neuronas. Ya que la insulina desencadena una cascada de señalización para modular la transcripción de *Pomc* (14), también se podría evaluar el efecto de la disminución de la sensibilidad a insulina, mediada por el ácido palmítico y esteárico, en la transcripción de *Pomc*.

Existe evidencia de que la inhibición de la autofagia hipotalámica, mediante el KO de genes esenciales de autofagia, tiene un efecto en la homeostasis energética a través de la modulación de la expresión y producción de péptidos anorexigénicos (36,59). Por ejemplo, en ratones obesos inducidos por HFD, el KO para el gen *Atg12* en neuronas POMC ocasiona la reducción de los niveles de mRNA de *Pomc* asociado a un incremento exacerbado del peso (36). Con la finalidad de evaluar el efecto de la inhibición de la autofagia en el modelo celular propuesto, se realizó el silenciamiento de *Atg7* y *Becn1* (ortólogo de *Atg6* en levaduras) en la línea celular N43/5 y se obtuvo que el silenciamiento de *Atg7*, pero no de *Becn1*, ocasionó un incremento significativo en los niveles transcripcionales de *Pomc* (Figura 6). ATG7 y BECLIN1 son proteínas ATG que

actúan en etapas específicas de la iniciación y formación de autofagosomas y su silenciamiento es suficiente para la disminución del proceso de autofagia (27), sin embargo, solo el silenciamiento de *Atg7* ocasionó el incremento en los niveles de *Pomc*. Estudios *in vivo* en roedores ya han demostrado que el *KO* de *Atg7* en las neuronas POMC ocasiona un incremento del peso asociado a la ingesta de alimentos, lo cual sugiere que la autofagia podría cumplir un rol fundamental para mantener la función anorexigénica de las neuronas hipotalámicas. Por lo tanto, es probable que el aumento de los niveles transcripcionales de *Pomc* después del silenciamiento de *Atg7* sea consecuencia de la inhibición de la autofagia mientras que, el efecto del silenciamiento de *Becn1* podría atribuirse a funciones no autofágicas del gen (64), las cuales podrían contribuir a que no se observen cambios. Por ejemplo, en la respuesta de inmunidad innata, la detección del ADN citosólico es mediada por la sintetasa de GMP-AMP cíclico [cGAMP] (cGAS) y en este escenario BECLIN 1 se une a cGAS para inhibir la síntesis de cGAMP y la producción de interferón (65). A pesar de que en el contexto de metabolismo y función anorexigénica aún no se ha evidenciado que BECLIN 1 ejerce funciones independientes de procesos relacionados con autofagia, para descartar esta opción se podrían realizar los mismos experimentos silenciando otras proteínas de autofagia.

Por otro lado, debido a que estos experimentos están hechos en una línea celular, resulta complicado especular la implicancia que tiene el aumento del transcrito de *Pomc*, mediado por la inhibición de la autofagia, en el equilibrio metabólico de un organismo. Sin embargo, es posible realizar experimentos en las células N43/5 que contribuyan a entender el rol de la autofagia en mecanismos celulares relacionados con la función anorexigénica de la neurona. Por ejemplo, los resultados obtenidos se podrían complementar con la evaluación de los niveles proteicos de POMC y su conversión a α -MSH después de la inhibición de la autofagia. Además, diferentes estudios resaltan el rol de las proteínas ATG en la secreción de proteínas citosólicas (66–69): Kaushik y colaboradores demostraron que la inhibición de la autofagia en células hipotalámicas N41 impide la localización de α -MSH en las proyecciones neuronales, lo cual sugiere que la autofagia podría estar involucrada en la secreción de α -MSH. Por este motivo, resulta

interesante explorar más adelante el rol de las proteínas ATG en la generación y secreción de α -MSH.

En conjunto, el ácido palmítico y el ácido esteárico inhiben el flujo autofágico y reducen la sensibilidad a la insulina a las seis horas de exposición, mientras que la inhibición de la autofagia también disminuye la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, uno de los mecanismos por el cual el ácido palmítico y el ácido esteárico disminuyen la sensibilidad a insulina podría ser a través de la inhibición del flujo autofágico. Con respecto a los niveles transcripcionales de *Pomc*, el ácido palmítico ocasiona su disminución a las seis horas mientras que el silenciamiento con *Atg7* aumenta el transcrito. Teniendo en cuenta la conexión entre la vía de señalización de insulina y la autofagia y, debido a que la insulina modula la transcripción de *Pomc* (14), para obtener una conclusión más clara, se podría evaluar el efecto de los ácidos grasos saturados en la transcripción de *Pomc* frente al estímulo de insulina.

En conclusión, el presente trabajo demuestra que el ácido palmítico y esteárico, dos de los componentes más abundantes de las dietas altas en grasa, tienen un efecto negativo en la autofagia y en la señalización de insulina en las neuronas hipotalámicas N43/5. Además, resalta el rol de la autofagia en la regulación de la señalización neuronal de la insulina y en la capacidad de modular los niveles transcripcionales de *Pomc*.

Estos resultados son un punto de partida para explorar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la desregulación de la autofagia, mediada por la exposición a ácidos grasos saturados, puede modular la función anorexigénica neuronal.

8. Conclusiones

1. El ácido palmítico y el ácido esteárico inhiben el flujo autofágico a 1 y 6 horas de tratamiento en línea celular de ratón N43/5.
2. El ácido palmítico y el ácido esteárico reducen la sensibilidad a la insulina a las 6 horas de tratamiento en la línea celular de ratón N43/5.
3. El ácido palmítico, pero no el esteárico, disminuye los niveles transcripcionales de *Pomc* en la línea celular de ratón N43/5.
4. La inhibición de la autofagia, a través del silenciamiento de *Atg7* y *Becn1*, ocasiona la reducción en la sensibilidad a insulina en la línea celular de ratón N43/5.
5. Son necesarios más ensayos experimentales para determinar el efecto de la inhibición de la autofagia sobre los niveles transcripcionales de *Pomc*.

9. Limitaciones y recomendaciones

La principal limitación de este trabajo de tesis fue que la evaluación de los niveles transcripcionales de *Pomc* no fueron suficientes para concluir si es que la función anorexigénica de las neuronas era afectada. Si bien la disminución de los niveles de *Pomc* después del tratamiento con PA, y la ausencia de cambios después de tratamiento con SA, son condiciones que podrían implicar una alteración en la regulación de POMC, se sugiere confirmar este supuesto mediante la evaluación de los niveles proteicos de POMC y α -MSH. Por otro lado, se esperaba obtener los mismos resultados con el silenciamiento de *Atg7* y *Becn1*, sin embargo solo el silenciamiento de *Atg7* ocasionó el

incremento de *Pomc*. Se sugiere realizar los mismos ensayos silenciando otras proteínas relacionadas a autofagia.

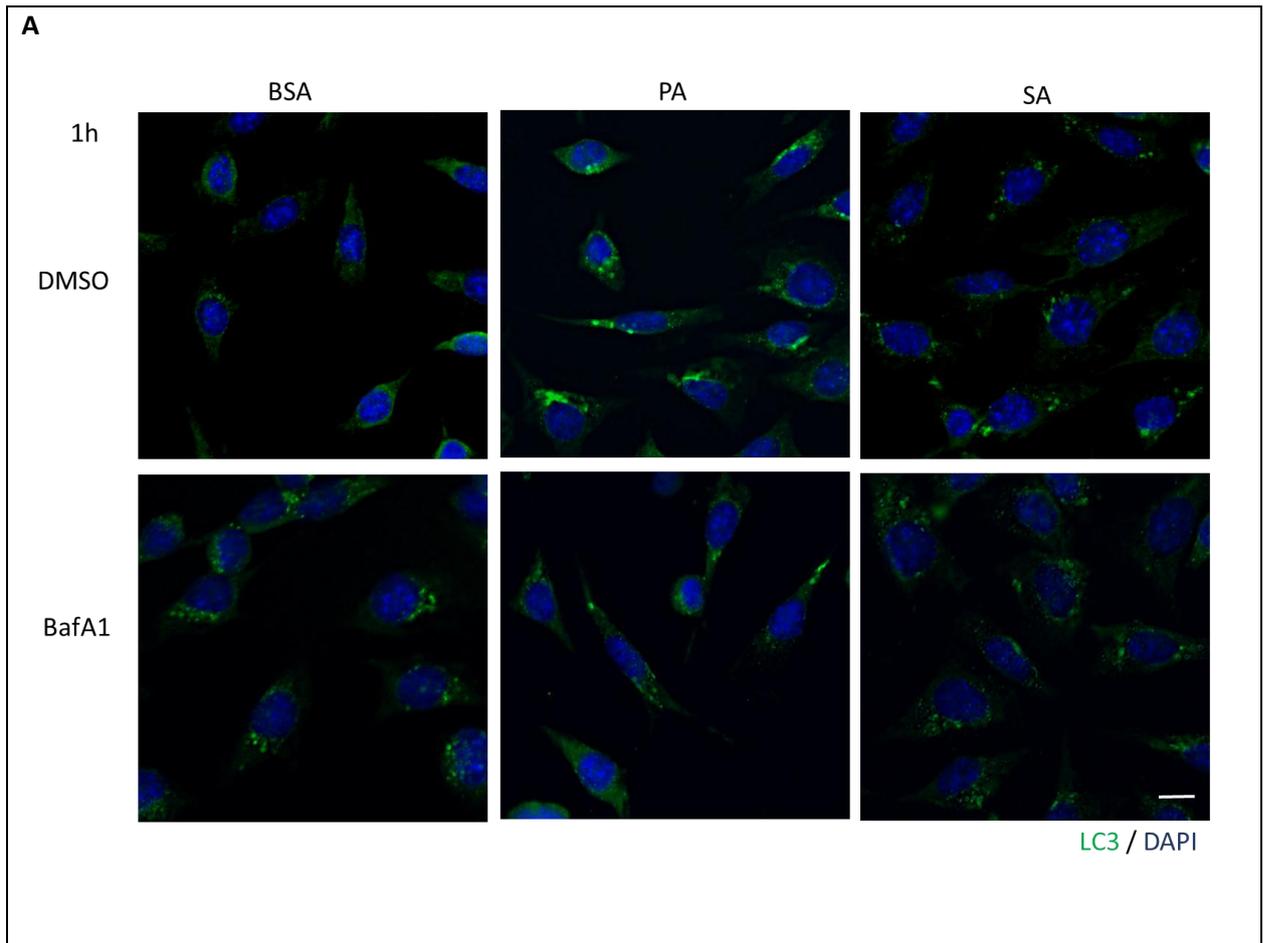
Debido a que estos experimentos están hechos en una línea celular, resulta complicado especular la implicancia que tiene este aumento del transcrito de *Pomc*, mediado por la inhibición de la autofagia, en el equilibrio metabólico de un organismo. Se sugiere complementar los resultados obtenidos, por ejemplo, con la evaluación de los niveles proteicos de POMC y su conversión a α -MSH después de la inhibición de la autofagia. Además, diferentes estudios resaltan el rol de las proteínas ATG en la secreción de proteínas citosólicas (66–69): Kaushik y colaboradores demostraron que la inhibición de la autofagia en células hipotalámicas N41 impide la localización de α -MSH en las proyecciones neuronales, lo cual sugiere que la autofagia podría estar involucrada en la secreción de α -MSH. Por este motivo, resulta interesante explorar más adelante el rol de autofagia en la generación y secreción de α -MSH tanto en la línea celular como en cultivo primario, terminalmente diferenciado.

Ya que los tratamientos con PA, SA y la inhibición de la autofagia disminuyen la sensibilidad a la insulina y, ya que la insulina desencadena la cascada de señalización para modular la transcripción de *Pomc* (14), se sugiere evaluar los niveles de *Pomc* después del estímulo con insulina en condiciones donde la autofagia haya sido inhibida o con tratamientos con ácidos grasos.

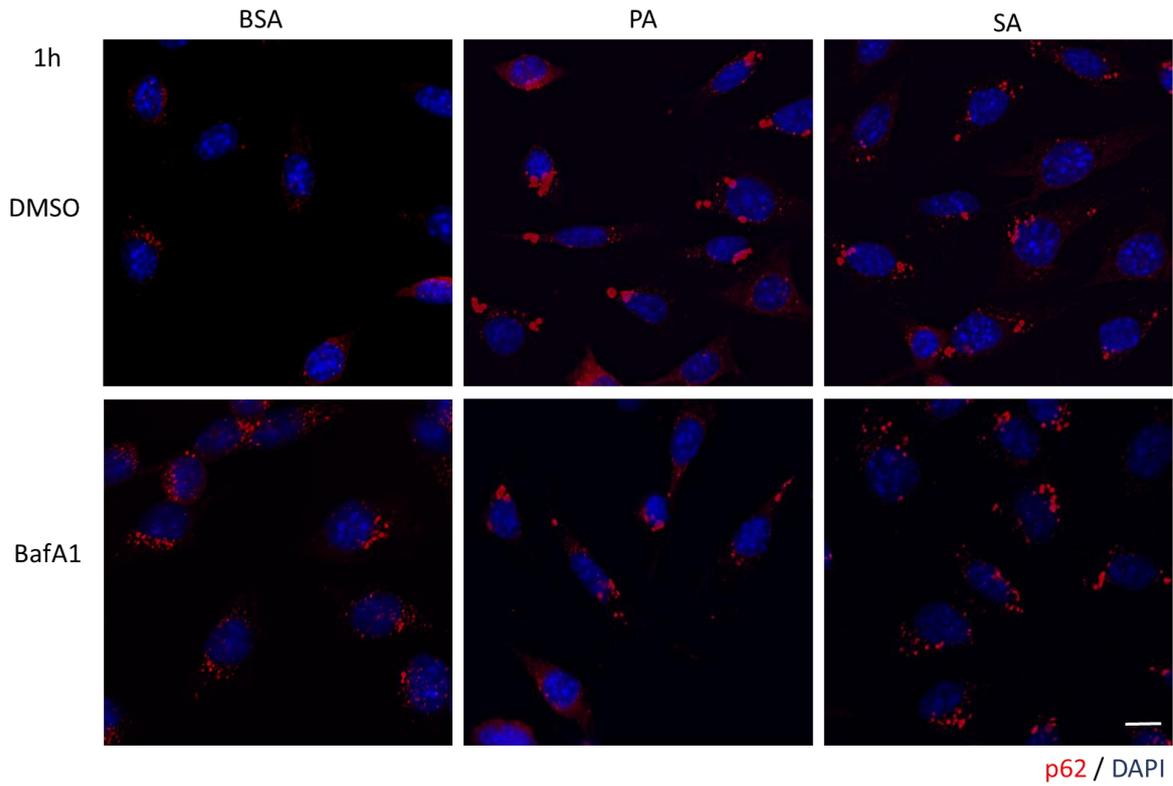
Se sugiere realizar experimentos futuros para determinar si el PA y el SA ocasionan la inhibición del flujo autofágico mediante la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma y/o mediante alteraciones en la acidificación de los lisosomas/autolisosomas. Finalmente, se sugiere evaluar si hay cambios en proteínas involucradas en el metabolismo y en la autofagia, por ejemplo el factor de transcripción EB (TFEB) el cual es un regulador de la autofagia, de la biogénesis de lisosomas y está asociado al catabolismo de lípidos (70). O, por ejemplo, evaluar la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) la cual controla el metabolismo de lípidos y se requiere para la maduración del autofagosoma y su fusión con el lisosoma (71).

10. Anexos

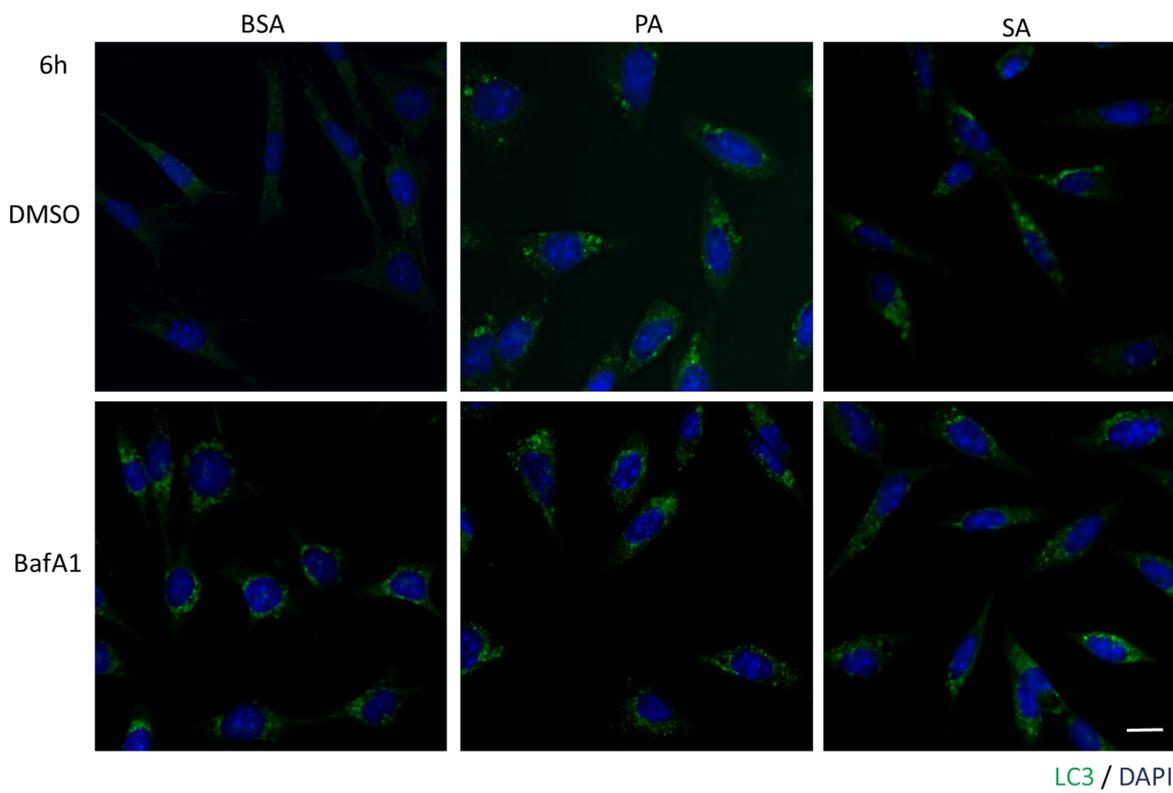
1. **Figura 7.** Imágenes representativas de células N43/5 tratadas durante 1h (A, B) y 6 hrs (C, D) con BSA (vehículo), ácido palmítico (100 μ M), ácido esteárico (100 μ M) en ausencia o presencia de BafA1 (100 nM), marcadas para LC3 (verde) y p62 (rojo). Núcleo marcado con DAPI (azul). Largo de la barra: 10 μ m.



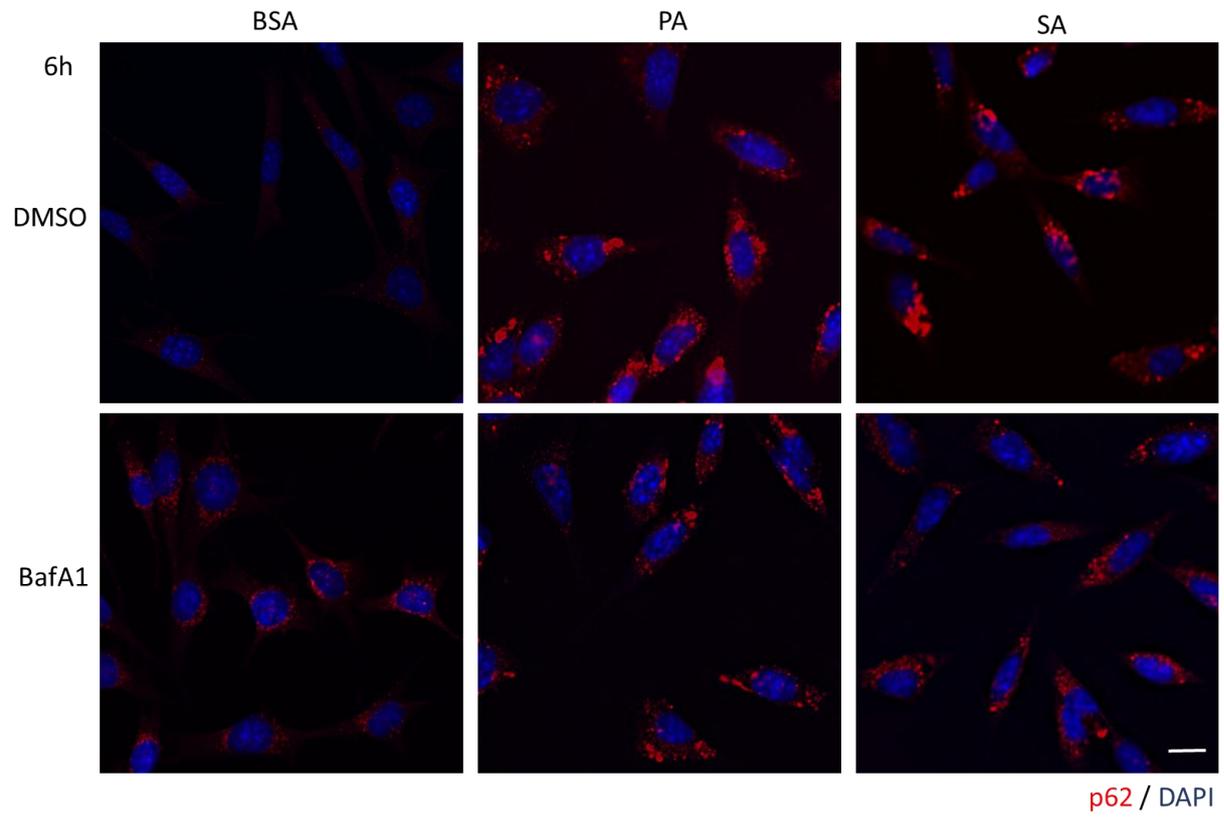
B



C



D



2. Eficiencia del silenciamiento de *Becn1* de ~50%, determinado mediante Western blot.

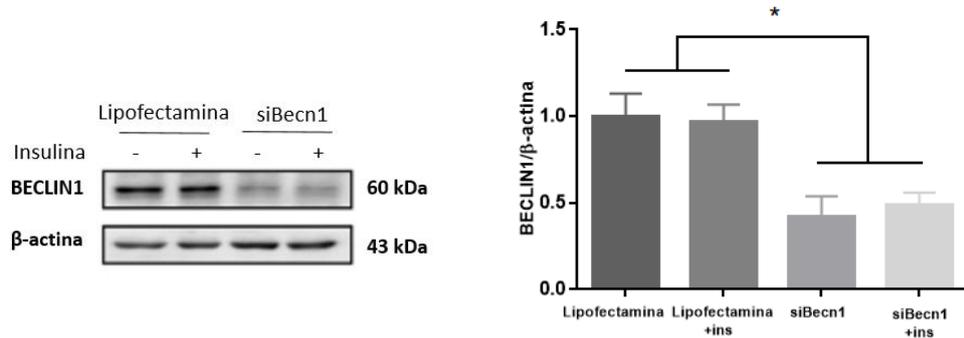


Figura 8. Western blot representativo de los niveles de BECLIN-1 (*Becn1*) en células N43/5 transfectadas con siRNA para el gen *Becn1* con o sin tratamiento con insulina durante 15 min. Como control las células fueron incubadas solo con lipofectamina RNAiMAX. Los datos están representados como la media \pm SEM. Se aplicó ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * $p < 0.05$. $n=3$.

3. Eficiencia del silenciamiento de *Atg7* de ~80%, determinado por real-time qPCR.

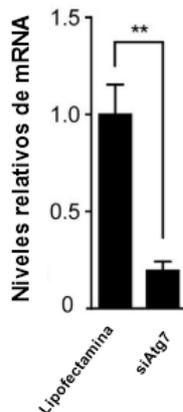


Figura 9. Niveles de mRNA de *Atg7* en células N43/5 transfectadas con siRNA para *Atg7*. Como control las células fueron incubadas solo con lipofectamina RNAiMAX. Los datos están representados como la media \pm SEM. Se aplicó t test. ** $p < 0.01$. $n=3$.

11. Bibliografía

1. WHO. Obesity and overweight [Internet]. [cited 2019 May 24]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Gukovsky I, Li N, Todoric J, Gukovskaya A, Karin M. Inflammation, Autophagy, and Obesity: Common Features in the Pathogenesis of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 May [cited 2019 May 24];144(6):1199-1209.e4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23622129>
3. Instituto Nacional de Estadística e Informática-INEI. PERÚ: Enfermedades no Transmisibles y Transmisibles, 2017 [Internet]. 2018. Available from: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1526/index.html
4. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. 2019 [cited 2019 May 27]; Available from: <https://doi.org/10.1017/S0007114500001720>
5. Mu M, Xu L-F, Hu D, Wu J, Bai M-J. Dietary Patterns and Overweight/Obesity: A Review Article. *Iran J Public Health* [Internet]. 2017 Jul [cited 2019 May 21];46(7):869–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28845396>
6. Opie LH, Walfish PG. Plasma Free Fatty Acid Concentrations in Obesity. *N Engl J Med* [Internet]. 1963 Apr 4 [cited 2019 May 24];268(14):757–60. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196304042681404>
7. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Dec 24 [cited 2019 May 21];9(6):2124–38. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714009723?via%3Dihub>
8. Morselli E, Criollo A, Rodriguez-Navas C, Clegg DJ. Chronic High Fat Diet

- Consumption Impairs Metabolic Health of Male Mice. *Inflamm cell Signal* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 10];1(6):e561. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046098>
9. Morselli E, Fuente-Martin E, Finan B, Kim M, Frank A, Garcia-Caceres C, et al. Hypothalamic PGC-1 α Protects Against High-Fat Diet Exposure by Regulating ER α . *Cell Rep* [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2019 May 21];9(2):633–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714008080?via%3Dihub>
 10. Rodriguez-Navas C, Morselli E, Clegg DJ. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol Metab* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2019 May 10];5(8):680–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212877816300771?via%3Dihub>
 11. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2009 May [cited 2019 May 10];296(5):E1003–12. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.90377.2008>
 12. Vagena E, Ryu JK, Baeza-Raja B, Walsh NM, Syme C, Day JP, et al. A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice by suppressing hypothalamic PKA signaling. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2019 Dec 10 [cited 2019 Aug 27];9(1):141. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41398-019-0470-1>
 13. Ruud J, Steculorum SM, Brüning JC. Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat Commun* [Internet]. 2017 May 4 [cited 2019 May 24];8:15259. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms15259>
 14. Vogt MC, Brüning JC. CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism – from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Feb [cited 2019 May 24];24(2):76–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265947>

15. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* [Internet]. 2012 Dec [cited 2019 May 9];13(12):1079. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23146889>
16. Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav* [Internet]. 2011 Apr 18 [cited 2019 May 23];103(1):10–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241723>
17. Ono H, Pocai A, Wang Y, Sakoda H, Asano T, Backer JM, et al. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2019 May 23];118(8):2959–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618016>
18. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2019 May 23];146(10):4192–9. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2004-1520>
19. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Sep [cited 2019 May 10];119(9):2577–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726875>
20. Huang X-F, Han M, South T, Storlien L. Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res* [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2019 May 24];992(1):9–19. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899303035534?via%3Dihub>
21. Lin S, Storlien LH, Huang X-F. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2019 Jul 1];875(1–2):89–95. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899300025804?via%3Dihub>

22. Tian D-R, Li X-D, Shi Y-S, Wan Y, Wang X-M, Chang J-K, et al. Changes of hypothalamic α -MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2019 May 24];25(12):2147–53. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978104003663?via%3Dihub>
23. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2019 May 24];458(7242):1131–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339967>
24. Pyo J-O, Nah J, Jung Y-K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* [Internet]. 2012 Jan 19 [cited 2019 May 27];44(2):73. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.3858/emm.2012.44.2.029>
25. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* [Internet]. 2014 Jan 24 [cited 2019 May 27];24(1):24–41. Available from:
<http://www.nature.com/articles/cr2013168>
26. Pugsley HR. Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 Jul 21 [cited 2019 May 24];(125). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784946>
27. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1–222.
28. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. *Mammalian Autophagy: How Does It Work?* 2016 [cited 2019 May 11]; Available from: www.annualreviews.org
29. Portovedo M, Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Coope A, Reginato A, Razolli DS, et al. Saturated Fatty Acids Modulate Autophagy's Proteins in the Hypothalamus. Aguila MB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 18 [cited 2019

- May 10];10(3):e0119850. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0119850>
30. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase beta (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2019 May 10];286(37):32324–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784844>
 31. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Jan 3 [cited 2019 May 24];122(1):153–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201683>
 32. Zhang Y, Sowers JR, Ren J. Targeting autophagy in obesity: From pathophysiology to management. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14(6):356–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0009-1>
 33. Ignacio-Souza LM, Bombassaro B, Pascoal LB, Portovedo MA, Razolli DS, Coope A, et al. Defective Regulation of the Ubiquitin/Proteasome System in the Hypothalamus of Obese Male Mice. *Endocrinology* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2019 May 10];155(8):2831–44. Available from:
<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2014-1090>
 34. Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metab* [Internet]. 2012 Feb 8 [cited 2019 May 24];15(2):247–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285542>
 35. Quan W, Kim HK, Moon EY, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, et al. Role of hypothalamic proopiomelanocortin neuron autophagy in the control of appetite and leptin response. *Endocrinology*. 2012;153(4):1817–26.
 36. Malhotra R, Warne JP, Salas E, Xu AW, Debnath J. Loss of Atg12, but not Atg5, in pro-opiomelanocortin neurons exacerbates diet-induced obesity. *Autophagy*. 2015;11(1):145–54.

37. Hernández-Cáceres MP, Toledo-Valenzuela L, Díaz-Castro F, Ávalos Y, Burgos P, Narro C, et al. Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(March):1–13.
38. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2019 May 23];119(9):2577–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726875>
39. Cai F, Gyulhandanyan A V, Wheeler MB, Belsham DD. Glucose regulates AMP-activated protein kinase activity and gene expression in clonal, hypothalamic neurons expressing proopiomelanocortin: additive effects of leptin or insulin. *J Endocrinol* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2019 May 24];192(3):605–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332528>
40. Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW, Kim EK. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* [Internet]. 2016;12(11):2009–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1215382>
41. Kaushik S, Arias E, Kwon H, Lopez NM, Athonvarangkul D, Sahu S, et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Rep* [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2019 May 24];13(3):258–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22249165>
42. Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metab* [Internet]. 2012 Feb 8 [cited 2019 May 24];15(2):247–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285542>
43. Quan W, Kim H-K, Moon E-Y, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, et al. Role of Hypothalamic Proopiomelanocortin Neuron Autophagy in the Control of Appetite and Leptin Response. *Endocrinology* [Internet]. 2012 Apr [cited 2019

- May 24];153(4):1817–26. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334718>
44. Kadegowda AKG, Yu L. Effects of Dietary Lipid Intake on Diabetes. *Funct Diet Lipids* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 May 10];151–76. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782422471000065>
45. Rodriguez-Navas C, Morselli E, Clegg DJ. Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol Metab* [Internet]. 2016 Aug [cited 2019 May 24];5(8):680–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27656405>
46. Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, et al. Rubicon Inhibits Autophagy and Accelerates Hepatocyte Apoptosis and Lipid Accumulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. 2016 [cited 2019 May 13]; Available from:
<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/hep.28820>
47. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J • Res Commun* [Internet]. [cited 2019 May 13]; Available from: www.fasebj.org
48. Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Kimura T, Namba T, Matsuda J, et al. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 May 29];28(5):1534–51. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27932476>
49. Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Dec 9 [cited 2019 May 29];286(49):42534–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859708>
50. Lee Y, Chou T-F, Pittman SK, Keith AL, Razani B, Weihl CC. Keap1/Cullin3 Modulates p62/SQSTM1 Activity via UBA Domain Ubiquitination. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Apr 4 [cited 2019 May 30];19(1):188–202. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124717303625?via%3Dihub#bib10>

51. Pan J-A, Sun Y, Jiang Y-P, Bott AJ, Jaber N, Dou Z, et al. TRIM21 Ubiquitylates SQSTM1/p62 and Suppresses Protein Sequestration to Regulate Redox Homeostasis. *Mol Cell* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2019 May 30];61(5):720–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26942676>
52. Peng H, Yang J, Li G, You Q, Han W, Li T, et al. Ubiquitylation of p62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress. *Cell Res* [Internet]. 2017 May [cited 2019 May 30];27(5):657–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28322253>
53. López-Vicario C, Alcaraz-Quiles J, García-Alonso V, Rius B, Hwang SH, Titos E, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: Role for omega-3 epoxides. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Jan 13 [cited 2019 Jun 5];112(2):536–41. Available from: <https://www.pnas.org/content/112/2/536>
54. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2016 Mar 18 [cited 2019 Jun 5];12(3):144–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2015.216>
55. Liu H, Javaheri A, Godar RJ, Murphy J, Ma X, Rohatgi N, et al. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. *Autophagy* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2019 Jun 5];13(11):1952–68. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2017.1368596>
56. Qian Q, Zhang Z, Orwig A, Chen S, Ding W-X, Xu Y, et al. S-Nitrosoglutathione Reductase Dysfunction Contributes to Obesity-Associated Hepatic Insulin Resistance via Regulating Autophagy. *Diabetes* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2019 Jun 5];67(2):193–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074597>
57. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* [Internet]. 2010 Jun 9 [cited 2019 May 30];11(6):467–78. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519119>
58. Quan W, Kim H-K, Moon E-Y, Kim SS, Choi CS, Komatsu M, et al. Role of Hypothalamic Proopiomelanocortin Neuron Autophagy in the Control of Appetite and Leptin Response. *Endocrinology* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2019 May 24];153(4):1817–26. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2011-1882>
 59. Kaushik S, Arias E, Kwon H, Lopez NM, Athonvarangkul D, Sahu S, et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Rep* [Internet]. 2012;13(3):258–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.260>
 60. Wang M, Wu H, Li S, Xu Z, Li X, Yang Y, et al. SYNJ2BP promotes the degradation of PTEN through the lysosome-pathway and enhances breast tumor metastasis via PI3K/AKT/SNAI1 signaling. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 27 [cited 2019 Jun 5];8(52):89692–706. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/21058>
 61. Tian D-R, Li X-D, Shi Y-S, Wan Y, Wang X-M, Chang J-K, et al. Changes of hypothalamic α -MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2019 May 27];25(12):2147–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978104003663?via%3Dihub>
 62. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, 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* [Internet]. 2009 Jan 14 [cited 2019 Jun 5];29(2):359–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144836>
 63. Razolli DS, de Araújo TM, Sant’Ana MR, Kirwan P, Cintra D, Merkle FT, et al. POMC processing in the hypothalamus is directly regulated by saturated fat – implications for the development of obesity. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2019 May 20 [cited 2019 May 31]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31104058>

64. Levine B, Kroemer G. Leading Edge Review Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 27];176:11–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
65. Liang Q, Seo GJ, Choi YJ, Kwak MJ, Ge J, Rodgers MA, et al. Crosstalk between the cGAS DNA sensor and beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell Host Microbe*. 2014 Feb 12;15(2):228–38.
66. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* [Internet]. 2010 Feb 22 [cited 2019 Jun 5];188(4):527–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156967>
67. Bruns C, McCaffery JM, Curwin AJ, Duran JM, Malhotra V. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J Cell Biol* [Internet]. 2011 Dec 12 [cited 2019 Jun 5];195(6):979–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144692>
68. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J* [Internet]. 2011 Nov 30 [cited 2019 Jun 5];30(23):4701–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068051>
69. Limanaqi F, Biagioni F, Gambardella S, Ryskalin L, Fornai F. Interdependency Between Autophagy and Synaptic Vesicle Trafficking: Implications for Dopamine Release. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2018 Aug 21 [cited 2019 May 6];11:299. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00299/full>
70. Settembre C, Ballabio A. Lysosome: Regulator of lipid degradation pathways. Vol. 24, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 743–50.
71. Jang M, Park R, Kim H, Namkoong S, Jo D, Huh YH, et al. AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).