

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CDMX, a 19 de Mayo del 2017

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA

• **Presente**

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad" con registro **CINVA: FNU-529-12/16-1**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López
Investigador en Ciencias Médicas C

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D.F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

REPORTE DE EVALUACIÓN DE INFORME TECNICO

| | |
|------------------------------|---|
| Fondo: | I0017- Fondo SEP - CONACYT |
| Solicitud: | 000000000155949- Interacción entre la oxidación |
| Etapas: | 001 |
| Título: | Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad |
| Usuario: | X_Inoriega40854 |
| Nombre: | NORIEGA LOPEZ LILIA GUADALUPE |
| formato: | INF_FINAL_CB- INFORME FINAL CIENCIA BASICA |
| Fecha: | 24 de mayo de 2016 |
| Estado del Documento: | En Proceso |
| | |
| Sección: | IFINAL_CB |
| Pregunta: | Capture aquí el resumen de este informe |
| Respuesta: | <p>La ENSANUT 2012 revelo que el sobrepeso y la obesidad son un problema de salud pública que afecta al 70% de la población entre los 30 y 60 años de nuestro país. Una de las principales alteraciones metabólicas que se presenta durante la obesidad es la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es el resultado de la acumulación de diacilglicerolos y ceramidas producto de la oxidación incompleta de los ácidos grasos y esto se ha asociado con un aumento en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada. Nuestra hipótesis sugiere que una mayor concentración de los aminoácidos de cadena ramificada disminuye la oxidación de los ácidos grasos y viceversa. Durante la primera etapa de este proyecto demostramos que, en las células 3T3-L1, la presencia de leucina disminuyó tanto la oxidación como la incorporación a lípidos y a proteínas del palmitato. Por otro lado, el palmitato aumentó la oxidación de leucina y disminuyó su incorporación a lípidos y proteínas. Durante la segunda etapa demostramos que, en adipocitos de ratas control y con obesidad inducida por dieta, la leucina disminuye la oxidación del palmitato y la incorporación de este a los lípidos y las proteínas de manera dependiente de la dosis. Por otro lado, el palmitato incrementa la oxidación de la leucina y disminuye su incorporación a lípidos y proteínas en una manera dependiente de la dosis. Durante el desarrollo de la tercera etapa se evaluó el efecto del palmitato sobre la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Interesantemente, el palmitato no modifico la expresión de la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada ni de la deshidrogenasa de los aminoácidos de cadena ramificada, lo que sugiere que el efecto es sobre la actividad de la enzima y no sobre la expresión. Estos resultados demuestran la interacción que existe entre el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y el palmitato y sus implicaciones y la importancia del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada para almacenar los lípidos en los adipocitos y por lo tanto, mantener su funcionalidad. Con estos resultados se escribió un artículo de investigación original que se encuentra en revisión en la revista Amino Acids. Además, se graduaron tres alumnas de licenciatura y una obtuvo la candidatura al grado de doctor. Adicionalmente, durante la segunda etapa de este proyecto se caracterizó el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y de la activación de los complejos de mTOR en las poblaciones de macrófagos clásica y</p> |

| | |
|------------------------------|---|
| | <p>alternativamente activados y se evaluó si el aumento en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada favorece la polarización a una población particular de macrófagos. Este trabajo demostró que: 1) los aminoácidos de cadena ramificada son utilizados principalmente en la síntesis de proteína en ambas poblaciones de macrófagos; 2) la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada se encuentra aumentado en las primeras horas de la inducción de la polarización; 3) la polarización hacia la población clásicamente activada incrementa la activación del complejo mTORC1 ya que hay una mayor fosforilación de la proteína S6K; y 4) que el aumento en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada no modifica la polarización de los macrófagos. Con estos resultados se escribió un artículo de investigación original que se encuentra en revisión en la revista International Journal of Biological Sciences. Además, con este trabajo la alumna Ana Elena Bunt Alatorre obtuvo el grado de Maestra en Ciencias en agosto de 2014. Finalmente, los recursos de este proyecto también contribuyeron para fortalecer la segunda línea de investigación que implemente en el Departamento de Fisiología de la Nutrición, y que tiene como objetivo caracterizar los mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que regulan el metabolismo. Dentro de esta línea de investigación, evaluamos el papel de SIRT7 en el metabolismo del colesterol y en la homeostasis ácido-base. En este último aspecto, hasta el momento hemos encontrado que SIRT7 colocaliza, interactúa, y desacetila al transportador de Cl⁻/K⁺ KCC4 promoviendo su actividad. Este efecto positivo de SIRT7 favorece la excreción de H⁺ para mitigar la acidosis metabólica y representa la primera función fisiológica renal identificada que esta regulada por SIRT7. Con estos resultados se escribió un artículo de investigación original que se encuentra en revisión en la revista Journal of Clinical Investigation.</p> |
| <p>observaciones:</p> | |
| <p>Pregunta:</p> | <p>Cuantitativamente, señale cuáles fueron los productos generados (Libros, Capítulos de Libro, Artículos, Tesis, etc.).</p> |
| <p>Respuesta:</p> | <p>Los productos generados fueron: 1) Artículos: 1.1 Estrada-Alcalde, I, Tenorio-Guzman, M., Tovar, A.R., Salinas-Rubio, D., Torre-Villalvazo, I., Torres, N. y Noriega, L.G. ¿Metabolic fate of branched-chain amino acids during adipogenesis, in adipocytes from mice fed a control or high-fat diet and in C2C12 myotubes? Enviado a Amino acids. 1.2 Bunt, A.E., Tovar, A.R., Torres, N., Ortiz, V., y Noriega, L.G. ¿Analysis of branched-chain amino acid metabolism and mTOR activation during macrophage polarization? Enviado a International Journal of Biological Science. 1.3 Melo, Z., Rajaram, R.D., Tovar, A.R., Mercado, A., Velazquez-Villegas, L., Cruz-Rangel, S., Ryu, D., Rojas-Vega, L., Debonneville, A., Doucet, A., Torres, N., Auwerx, J., Staub, O., Gamba, G., y Noriega, L.G. ¿SIRT7 modulates renal acid-base homeostasis through the deacetylation of the K⁺:Cl⁻ cotransporter KCC4? Enviado al Journal of Clinical Investigation. 2) Tesis: 2.1 L.N. Ana Elena Bunt Alatorre. Análisis del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y de la activación de mTOR durante la polarización de los macrófagos. Maestría en Biomedicina Molecular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. Agosto 2014. 2.2 Miriam Rosset Tenorio Guzmán. Estudio de la regulación transcripcional de la transaminasa y deshidrogenasa de los aminoácidos de cadena ramificada en tejidos extrahepáticos de ratones con obesidad inducida por dieta y durante la adipogénesis. Licenciatura en Nutrición. Universidad del Centro de México, San Luis Potosí. Octubre 2013. 2.3 Isabela Estrada Alcalde. El papel de la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada durante la adipogénesis y en adipocitos de ratones con obesidad inducida por dieta. Tutor: Lilia G. Noriega López. Licenciatura en Nutrición. Universidad del Centro de México, San Luis Potosí. 2013. 2.4 Daniela Salinas Rubio. Efecto de la presencia de ácidos grasos sobre el destino metabólico de los aminoácidos de cadena ramificada y viceversa en miocitos y adipocitos durante la obesidad. Licenciatura en Dietética y Nutrición. Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE, México. 2013. 3) Presentaciones en congresos: 3.1 Melo, Z., Tovar, A.R., Cruz-Rangel, S., Mercado, A., Ryu, D., Torres, N., Gamba, G., Noriega, L. ¿Sirtuin 7 modulates renal acid-base homeostasis through deacetylation of the K⁺:Cl⁻ cotransporter, KCC4? ASN Kidney Week 2014 Annual Meeting. Philadelphia, PA. Noviembre 2014. 3.2 Salinas-Rubio, D., Torres, N., Tovar, A.R., Noriega, L.G. ¿Effect of palmitate on the metabolic fate of leucine and vice versa in primary adipocytes of a rat</p> |

| | |
|------------------------------|--|
| | <p>model of diet-induced obesity? Experimental Biology. San Diego, CA. Abril, 2014. 3.3 Bunt-Alatorre, A.E., Tovar-Palacio, A.R., Torres y Torres, N., Ortiz-Navarrete, V., Noriega-López, L.G. ¿Analysis of Branched-chain amino acid metabolism and mTOR activation during macrophage polarization? XXX Congreso Nacional de Bioquímica. Noviembre 2014. Guadalajara, Jalisco. México. 3.4 Salinas-Rubio, D., Torres, N., Tovar, A.R., Noriega, L.G. ¿Effect of palmitate in the metabolic fate of leucine and viceversa in 3T3L1-adipocytes and C2C12-myotubes? Metabolic Signaling and Disease: From Cell to Organism. Cold Spring Harbor, NY. Agosto 2013. 3.5 Noriega-López, L., Estrada, I., Tenorio, M., Torres, N., and Tovar-Palacio, A. ¿BCAT2 regulates BCAA metabolic fate during adipogenesis? Experimental Biology. Boston, MA. Abril, 2013. 3.6 Noriega-López, L., Torre-Villalvazo, I., Contreras, A., Torres, N., and Tovar-Palacio, A. ¿BCATm and BCKDH expression in mouse adipose tissue upon different metabolic challenges? Experimental Biology. San Diego, CA. Abril, 2012.</p> |
| <p>observaciones:</p> | |
| <p>Pregunta:</p> | <p>Indique si se dio cumplimiento a los objetivos, metas y/o productos comprometidos (Fundamente/Justifique)</p> |
| <p>Respuesta:</p> | <p>Se dio cumplimiento a los objetivos, metas y/o productos comprometidos para cada uno de las etapas. Durante la primera etapa del proyecto se determino el destino metabólico de los BCAA durante la adipogénesis y en adipocitos de ratones y ratas con obesidad inducida por dieta. Durante la adipogénesis, la expresión de BCAT y BCKDH de los aminoácidos de cadena ramificada se incrementa por lo que existe una mayor oxidación de BCAAs y su incorporación a lípidos provocando una menor incorporación de ellos a síntesis de proteínas. Por el contrario, durante la obesidad, cuando la funcionalidad de los adipocitos se ve atrofiada, la expresión de BCKDH de los aminoácidos de cadena ramificada disminuye. Como consecuencia existe una menor oxidación de los BCAAs. Sin embargo, esto no provoca una incorporación de ellos a síntesis de proteínas ni formación de lípidos, sino que también disminuyen. Durante la segunda etapa se realizo cultivo primario de adipocitos tanto de ratas normales como de ratas con obesidad inducida por dieta. Los resultados demuestran que la leucina disminuye la oxidación del palmitato y la incorporación de este al los lípidos y las proteínas de manera dependiente de la dosis. Por otro lado, el palmitato incrementa la oxidación de la leucina y disminuye su incorporación a lípidos y proteínas en una manera dependiente de la dosis. Interesantemente, en los adipocitos de ratas con obesidad inducida por dieta el comportamiento es el mismo. Por otro lado, se caracterizo el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en los macrófagos y se evaluó si el aumento en la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada favorece la polarización a una población particular de macrófagos. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que: 1) los aminoácidos de cadena ramificada son utilizados principalmente en la síntesis de proteína tanto en los macrófagos clásica y alternativamente activado; 2) el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada se encuentra aumentado en las primeras horas de la inducción de la polarización; y 3) la polarización hacia la población clásicamente activada incrementa la activación de mTOR ya que hay una mayor fosforilación de la proteína S6K. Además, se llevo acabo la exportación de ratones deficientes SIRT7 del laboratorio del Profesor Auwerx de la Escuela Politécnica Federal de Lausana en Suiza que son de gran utilidad para evaluar el papel de SIRT7 en el metabolismo del colesterol y en la homeostasis ácido-base. Finalmente durante la tercera etapa se evaluó el efecto del palmitato sobre la expresión de la enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos. Interesantemente, el palmitato no modifico la expresión de la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada ni de la deshidrogenasa de los aminoácidos de cadena ramificada, lo que sugiere que el efecto es sobre la actividad de la enzima y no sobre la expresión. También, utilizando ovocitos, líneas celulares y los ratones deficientes de SIRT7 se determino que SIRT7 colocaliza, interactúa, y desacetila al transportador de Cl-/K+ KCC4 promoviendo su actividad y por tanto representa un punto de regulación para la homeostasis ácido-base.</p> |
| <p>observaciones:</p> | |

| | |
|--------------------------|---|
| Pregunta: | Con base en los productos generados, señale los alcances en: a) Generación del conocimiento, b) Formación de recursos humanos especializados y c) Creación y/o fortalecimiento de grupos de investigación |
| Respuesta: | Los alcances son los siguientes: a) Generación del conocimiento: El desarrollo del presente trabajo permitió establecer que los aminoácidos de cadena ramificada están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina por dos situaciones: 1) la disminución de la oxidación del palmitato en adipocitos funcionales, efecto que se preserva en adipocitos de ratas con obesidad inducida por dieta; y 2) la modificación de la respuesta inflamatoria por los macrófagos clásica y alternativamente activados. Además permitió establecer la primera función biológica renal de SIRT7, y a la acetilación como una modificación postransduccional que regula la función de los transportadores lo que abre la puerta a estudiar el efecto de la acetilación en otros transportadores y procesos renales, así como la implicación de SIRT7 en estos procesos. b) Formación de recursos humanos especializados. Con el desarrollo de este proyecto se graduaron cuatro alumnos de licenciatura en Nutrición y una maestra en Ciencias. Adjunto encontrara los documentos probatorios. c) Creación y/o fortalecimiento de grupos de investigación. El desarrollo de este proyecto permitió establecer dos líneas de investigación bajo mi dirección en el departamento de fisiología de la nutrición, permitiendo fortalecer nuestro grupo. Las líneas de investigación son: Estudio de las alteraciones del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada durante la obesidad y la diabetes. Caracterización de mecanismos transcripcionales y postransduccionales que regulan el metabolismo: el papel de las sirtuinas. |
| observaciones: | |
| Pregunta: | En términos de impacto, destaque las principales contribuciones de su investigación |
| Respuesta: | Las principales contribuciones de la investigación: 1) Demuestran la interacción que existe entre el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y el palmitato y sus implicaciones, incluyendo que los aminoácidos de cadena ramificada participan en el almacenaje de los lípidos en los adipocitos y por lo tanto, a mantener su funcionalidad. 2) Caracterizan el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en los macrófagos clásica y alternativamente activados. 3) Demuestran la primera función fisiológica renal identificada que esta regulada por SIRT7. |
| observaciones: | |
| Pregunta: | Cuáles argumentos plantearía como sustantivos para integrar su investigación dentro de los CASOS DE ÉXITO. |
| Respuesta: | El desarrollo de esta investigación puede considerarse dentro de los casos de éxito por las siguientes razones: 1) Permitió establecer la interacción que existe entre el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y el palmitato y sus implicaciones, incluyendo que los aminoácidos de cadena ramificada participan en el almacenaje de los lípidos en los adipocitos y por lo tanto, a mantener su funcionalidad. Se caracterizó el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en los macrófagos clásica y alternativamente activados. Y demostró la primera función fisiológica renal identificada que esta regulada por SIRT7. 2) Se obtuvieron tres artículos que son publicables en revistas con arbitraje estricto. 3) Se graduaron cuatro estudiantes de licenciatura y uno de maestría. 4) Se establecieron dos líneas de investigación en el departamento de fisiología de la nutrición lo que contribuye a fortalecer nuestro grupo de investigación. 5) Se estableció una colaboración con el grupo del Profesor Auwerx en la Escuela Politecnica Federal de Lausana en Suiza lo que contribuye al desarrollo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. |
| observaciones: | |
| Observaciones: | |
| Documentos Anexos | |



PDF



Info

Journal of Cellular Biochemistry

Este artículo fué publicado el 28 de noviembre del 2016 como puede ser comprobado en la página de la revista (línea en amarillo) y actualmente cuenta con número y volumen como lo solicita la convocatoria de estímulos, el artículo se encuentra completo después de esta imagen.

Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids During Adipogenesis, in Adipocytes From Obese Mice and C2C12 Myotubes

Isabela Estrada-Alcalde, Miriam R. Tenorio-Guzman,

Armando R. Tovar, Daniela Salinas-Rubio, Ivan Torre-Villalvazo,

Nimbe Torres, Lilia G. Noriega

First published: 28 November 2016 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/jcb.25755 [View/save citation](#)

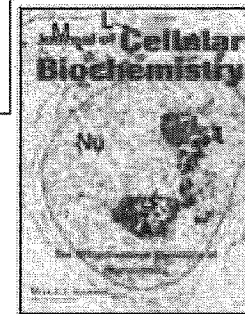
Cited by: 0 articles [Citation tools](#)

1

[Funding Information](#)

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Isabela Estrada-Alcalde and Miriam R. Tenorio-Guzman have contributed equally.



[View Issue TOC](#)
Volume 118, Issue 4
April 2017
Pages 808-818

Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids During Adipogenesis, in Adipocytes From Obese Mice and C2C12 Myotubes

Isabela Estrada-Alcalde, Miriam R. Tenorio-Guzman, Armando R. Tovar, Daniela Salinas-Rubio, Ivan Torre-Villalvazo, Nimbe Torres, and Lilia G. Noriega*

Depto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México, México

ABSTRACT

Branched-chain amino acid (BCAA) catabolism is regulated by the branched-chain aminotransferase (BCAT2) and the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex (BCKDH). BCAT2 and BCKDH expression and activity are modified during adipogenesis and altered in adipose tissues of mice with genetic or diet-induced obesity. However, little is known about how these modifications and alterations affect the intracellular metabolic fate of BCAAs during adipogenesis, in adipocytes from mice fed a control or high-fat diet or in C2C12 myotubes. Here, we demonstrate that BCAAs are mainly incorporated into proteins during the early stages of adipocyte differentiation. However, they are oxidized and incorporated into lipids during the late days of differentiation. Conversely, 92% and 97% of BCAA were oxidized, 1.6% and 6% were used for protein synthesis and 1.2% and 1.5% were incorporated into lipids in adipocytes from epididymal and subcutaneous adipose tissue, respectively. All three pathways were decreased in adipocytes from mice fed a high-fat diet. In C2C12 myotubes, leucine is mainly used for protein synthesis and palmitate is incorporated into lipids. Interestingly, leucine decreased both palmitate oxidation and its incorporation to lipids and proteins; and palmitate increased leucine oxidation and decreased its incorporation to lipids and proteins in a dose-dependent manner. These results demonstrate that BCAA metabolic fate differs between the early and late stages of adipocyte differentiation and in adipocytes from mice fed a control or high-fat diet; and that leucine affects the metabolic fate of palmitate and vice versa in C2C12 myotubes. *J. Cell. Biochem.* 118: 808–818, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: BCAA; OBESITY; ADIPOCYTE; METABOLIC FATE; ADIPOGENESIS; C2C12

Obesity and insulin resistance are associated with an increase in plasma branched-chain amino acids (BCAAs), which include leucine, isoleucine, and valine [Felig et al., 1969; She et al., 2007; Newgard et al., 2009]. Furthermore, an increase in BCAAs and the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine is associated with a fivefold higher risk for development of type 2 diabetes [Wang et al., 2011b]. Among the proposed mechanisms that explain the increase in plasma BCAAs, alterations in BCAA utilization have gained much attention in recent years [Lynch and Adams, 2014]. BCAAs have different metabolic fates including their incorporation into protein synthesis or their catabolism. The first reaction in BCAA catabolism is a transamination catalyzed by the branched-chain aminotransferase (BCAT2) in extrahepatic tissues, followed by an irreversible oxidative decarboxylation catalyzed by the branched-chain α -keto

acid dehydrogenase complex (BCKDH) [Brosnan and Brosnan, 2006]. After these steps, the skeletal carbons from BCAAs generate Krebs cycle intermediates, including the formation of acetyl CoA, that can also be used for synthesis of lipids such as fatty acids or cholesterol [Rosenthal et al., 1974]. Thus, BCAAs have a third metabolic fate in addition to protein synthesis and oxidation to CO₂ and H₂O, the synthesis of lipids.

Adipose tissue plays an important role in modulating circulating BCAA levels that are impaired during obesity. For instance, the activity of BCAT2 and BCKDH is reduced in adipose tissue of mice and rats with genetic or diet-induced obesity, and this is associated with an increase in plasma BCAAs [She et al., 2007; Lackey et al., 2013]. In obese humans, BCAT2 and BCKDH expression is reduced mainly in visceral adipose tissue [Lackey et al., 2013;

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest. Isabela Estrada-Alcalde and Miriam R. Tenorio-Guzman have contributed equally.

Grant sponsor: CONACYT; **Grant number:** 155949.

*Correspondence to: Lilia G. Noriega, Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, D.F., CP.14080, Mexico. E-mail: lgnoriegal@gmail.com

Manuscript Received: 11 July 2016; Manuscript Accepted: 29 September 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 29 September 2016

DOI 10.1002/jcb.25755 • © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids During Adipogenesis, in Adipocytes From Obese Mice and C2C12 Myotubes

Isabela Estrada-Alcalde, Miriam R. Tenorio-Guzman, Armando R. Tovar, Daniela Salinas-Rubio, Ivan Torre-Villalvazo, Nimbe Torres, and Lilia G. Noriega*

Depto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México, México

ABSTRACT

Branched-chain amino acid (BCAA) catabolism is regulated by the branched-chain aminotransferase (BCAT2) and the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex (BCKDH). BCAT2 and BCKDH expression and activity are modified during adipogenesis and altered in adipose tissues of mice with genetic or diet-induced obesity. However, little is known about how these modifications and alterations affect the intracellular metabolic fate of BCAAs during adipogenesis, in adipocytes from mice fed a control or high-fat diet or in C2C12 myotubes. Here, we demonstrate that BCAAs are mainly incorporated into proteins during the early stages of adipocyte differentiation. However, they are oxidized and incorporated into lipids during the late days of differentiation. Conversely, 92% and 97% of BCAA were oxidized, 1.6% and 6% were used for protein synthesis and 1.2% and 1.5% were incorporated into lipids in adipocytes from epididymal and subcutaneous adipose tissue, respectively. All three pathways were decreased in adipocytes from mice fed a high-fat diet. In C2C12 myotubes, leucine is mainly used for protein synthesis and palmitate is incorporated into lipids. Interestingly, leucine decreased both palmitate oxidation and its incorporation to lipids and proteins; and palmitate increased leucine oxidation and decreased its incorporation to lipids and proteins in a dose-dependent manner. These results demonstrate that BCAA metabolic fate differs between the early and late stages of adipocyte differentiation and in adipocytes from mice fed a control or high-fat diet; and that leucine affects the metabolic fate of palmitate and vice versa in C2C12 myotubes. *J. Cell. Biochem.* 118: 808–818, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: BCAA; OBESITY; ADIPOCYTE; METABOLIC FATE; ADIPOGENESIS; C2C12

Obesity and insulin resistance are associated with an increase in plasma branched-chain amino acids (BCAAs), which include leucine, isoleucine, and valine [Felig et al., 1969; She et al., 2007; Newgard et al., 2009]. Furthermore, an increase in BCAAs and the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine is associated with a fivefold higher risk for development of type 2 diabetes [Wang et al., 2011b]. Among the proposed mechanisms that explain the increase in plasma BCAAs, alterations in BCAA utilization have gained much attention in recent years [Lynch and Adams, 2014]. BCAAs have different metabolic fates including their incorporation into protein synthesis or their catabolism. The first reaction in BCAA catabolism is a transamination catalyzed by the branched-chain aminotransferase (BCAT2) in extrahepatic tissues, followed by an irreversible oxidative decarboxylation catalyzed by the branched-chain α -keto

acid dehydrogenase complex (BCKDH) [Brosnan and Brosnan, 2006]. After these steps, the skeletal carbons from BCAAs generate Krebs cycle intermediates, including the formation of acetyl CoA, that can also be used for synthesis of lipids such as fatty acids or cholesterol [Rosenthal et al., 1974]. Thus, BCAAs have a third metabolic fate in addition to protein synthesis and oxidation to CO₂ and H₂O, the synthesis of lipids.

Adipose tissue plays an important role in modulating circulating BCAA levels that are impaired during obesity. For instance, the activity of BCAT2 and BCKDH is reduced in adipose tissue of mice and rats with genetic or diet-induced obesity, and this is associated with an increase in plasma BCAAs [She et al., 2007; Lackey et al., 2013]. In obese humans, BCAT2 and BCKDH expression is reduced mainly in visceral adipose tissue [Lackey et al., 2013;

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest. Isabela Estrada-Alcalde and Miriam R. Tenorio-Guzman have contributed equally.

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 155949.

*Correspondence to: Lilia G. Noriega, Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, D.F., CP.14080, Mexico. E-mail: lgnoriegal@gmail.com

Manuscript Received: 11 July 2016; Manuscript Accepted: 29 September 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 29 September 2016

DOI 10.1002/jcb.25755 • © 2016 Wiley Periodicals, Inc.



Interaction between leucine and palmitate catabolism in 3T3-L1 adipocytes and primary adipocytes from control and obese rats

Daniela Salinas-Rubio^a, Armando R. Tovar^a, Iván Torre-Villalvazo^a, Omar Granados-Portillo^a, Nimbe Torres^a, José Pedraza-Chaverri^b, Lilia G. Noriega^{a,*}

^aDepto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México, Mexico

^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Received 12 March 2018; received in revised form 14 May 2018; accepted 31 May 2018

Abstract

Metabolic profiling studies have highlighted increases in the plasma free fatty acid (FFA) and branched-chain amino acid (BCAA) concentrations, which are hallmarks of the obese and insulin-resistant phenotype. However, little is known about how the increase of the BCAA concentration modifies the metabolic fate of FFA, and *vice versa*, in adipocytes. Therefore, we incubated differentiated 3T3-L1 adipocytes or primary adipocytes from rats fed a control or a high-fat diet with: (1) 0, 250, 500 and 1000 μM of leucine and determined the oxidation and incorporation of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitate into lipids or proteins or (2) 0, 250, 500 or 1000 μM of palmitate and evaluated the oxidation and incorporation of [$U\text{-}^{14}\text{C}$]-leucine into lipids or proteins. Leucine decreased palmitate oxidation and increased its incorporation into the lipid fraction in adipocytes; the latter was reduced in adipocytes from obese rats. However, palmitate increased leucine oxidation in adipocytes as well as reduced leucine incorporation into the protein and lipid fractions in adipocytes from obese rats. These results demonstrate that leucine modifies the metabolic fate of palmitate, and *vice versa*, in adipocytes and that the metabolic interaction between leucine and palmitate catabolism is altered in adipocytes from obese rats.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Leucine; Palmitate; Obesity; Metabolic fate; Adipocytes; BCAA

1. Introduction

Obesity is a chronic disease that is characterized by an increase in adipose tissue and by metabolic alterations that predispose individuals to the development of type 2 diabetes [1]. Adipose tissue modulates glucose and lipid homeostasis [2]; its role in amino acid metabolism has also been recognized but has been less explored. The role of adipose tissue in branched-chain amino acid (BCAA) metabolism has been recently assessed [3]. Several studies have shown that animal models of genetic or diet-induced obesity [4–6] and, more importantly, people with obesity have higher plasmatic concentrations of BCAAs [7–9]; this increase is associated with a decrease in the expression and the activity of the BCAA catabolic enzymes, branched-chain aminotransferase 2 (BCAT2) and the branched-chain keto acid dehydrogenase complex (BCKDH), specifically in adipose tissue [4,10]. Furthermore, mice harboring a genetic deletion of BCAT2 (BCAT2^{-/-}) have extremely high levels of plasma BCAA, and notably,

transplantation of wild-type adipose tissue to BCAT2^{-/-} mice decreases plasma BCAAs levels by 30%–40%, demonstrating the importance of adipose tissue in BCAA homeostasis [11,12].

In addition, the BCAA metabolic fate differs through adipocyte differentiation and in adipocytes from animals fed a high-fat diet (HFD). Briefly, preadipocytes use glucose and glutamine for acetyl-CoA synthesis, and in contrast, during the late days of differentiation, leucine contributes to almost 30% of the lipogenic AcCoA pool [13] and is highly incorporated into the lipid fraction [14]. Moreover, oxidation and incorporation of leucine into lipid and protein fractions were reduced in adipocytes from animals fed HFD [14]. This finding could be explained, in part, by the reduced expression and activity of the BCAA catabolic enzymes in adipocytes during obesity. However, the presence of other metabolites, such as free fatty acids (FFA), could also affect BCAA metabolism, and *vice versa*. For example, BCAA catabolism produces intermediates of the tricarboxylic acid cycle that modulate FFA oxidation flux, as observed in the skeletal muscle of histone-deacetylase-3-deficient mice, which showed an increase in lipid oxidation that was promoted by higher BCAA catabolism [15]. Further, activation of the BCKDH complex using chloroisoacaproic acid, a nonmetabolized α -ketoisocaproic acid mimetic, increased fatty acid oxidation in C2C12 myotubes, demonstrating that increased BCAA catabolism enhances FFA oxidation [16].

* Corresponding author at: Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, Ciudad de México, CP.14080, Mexico. Tel.: +52 55 55870900x2809; fax: +52 55 56553038.

E-mail address: lnoriega@gmail.com. (L.G. Noriega).

JASN

SIRT7 modulates renal acid-base homeostasis through the deacetylation of the KCl cotransporter KCC4

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Journal of the American Society of Nephrology</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript Type: | Original Article - Basic Research |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Noriega, Lilia; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Melo, Zesergio; Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran Rajaram, Renuga Devi; University of Lausanne Mercado, Adriana; Instituto Nacional de Cardiologia Ignacio Chavez Tovar, Armando; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Velazquez-Villegas, Laura; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Castañeda-Bueno, María; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Reyés-López, Yazmín; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Ryu, Dongryeol; Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne Rojas-Vega, Lorena; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Sánchez-Hernández, Mariana; Instituto Nacional de Cardiologia Ignacio Chavez Debonneville, Anne; University of Lausanne Doucet, Alain; Centre de recherche les cordeliers, ERL7226 Cheval, Lydie; Centre de Recherche des Cordeliers, ERL 8228 - UMRS 872 Torres, Nimbe; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran Auwerx, Johan; Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 6Laboratory of Integrative and Systems Physiology Staub, Olivier; University of Lausanne, Pharmacology & Toxicology; Gamba, Gerardo; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran |
| Keywords: | renal tubular acidosis, sirtuins, kidney tubule |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **SIRT7 modulates renal acid-base homeostasis through the deacetylation**
4
5
6 **of the KCl cotransporter KCC4**
7

8 Lilia G. Noriega¹, Zesergio Melo^{2,3}, Renuga D. Rajaram^{4,5}, Adriana Mercado⁶, Armando R. Tovar¹,
9
10 Laura A. Velazquez-Villegas^{1,11}, María Castañeda-Bueno², Yazmín Reyes-López¹, Dongryeol
11
12 Ryu^{7,12}, Lorena Rojas-Vega², Mariana Sánchez-Hernández⁶, Anne Debonneville^{4,5}, Alain Doucet⁸,
13
14 Lydie Cheval⁸, Nimbe Torres¹, Johan Auwerx⁷, Oliver Staub^{4,5}, Gerardo Gamba^{2,9,10}
15
16

17 Departments of ¹Nutrition Physiology and ²Nephrology and Mineral Metabolism,
18
19 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, 14080, Mexico.
20
21 ³CONACYT-Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social,
22 Guadalajara, Jalisco, Mexico.

23 ⁴Department of Pharmacology and Toxicology, University of Lausanne,
24 Lausanne, CH-1011, Switzerland.
25

26 ⁵National Centre of Competence in Research, "Kidney.ch", Switzerland
27

28 ⁶Department of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez,
29 Mexico City, 14080, Mexico.
30

31 ⁷Laboratory of Integrative Systems Physiology (LISP),
32

33 Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, CH-1015 Switzerland.
34

35 ⁸Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Universités, USPC, Université Paris
36 Descartes, Université Paris Diderot, Physiologie Rénale et Tubulopathies, CNRS ERL 8228,
37 F-75006 Paris, France.
38

39 ⁹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, NL Mexico
40

41 ¹⁰Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
42

43 Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 14080, Mexico.
44

45 Present address: ¹¹Laboratory of Metabolic Signaling, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne,
46 Lausanne, CH-1015 Switzerland. ¹²Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University
47 School of Medicine, Suwon, 16419, Republic of Korea.

48 LGN, ZM and RDR contributed equally to this work.
49

50 Address Correspondence to: Lilia G. Noriega (ignoriegal@gmail.com) or Gerardo Gamba
51 (gamba@biomedicas.unam.mx), Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico,
52
53 +52(55)54870900 ext. 2802 or 6107.
54
55

56 Running title: SIRT7 regulates acid-base balance; Abstract word count: 243; Text word count:3,584.
57

58
59 Keywords: SIRT7, KCC4, deacetylation, acid-base homeostasis, renal
60

Significance Statement

The kidney is one of the tissues that express the highest levels of Sirtuin 7 (SIRT7), however no role of SIRT7 has been described in renal physiology. Here, using *Xenopus laevis* oocytes, HEK293 cells and a mouse model of metabolic acidosis in wild-type and SIRT7-deficient mice, we demonstrate that SIRT7 interacts with and stabilizes the K-Cl cotransporter KCC4 by modulating its activity through deacetylation. Moreover, metabolic acidosis upregulates both SIRT7 and KCC4 expression, and the later is prevented in the total and inducible renal tubule-specific SIRT7-deficient mice. Altogether, our results reveal a novel role for SIRT7 in renal acid-base homeostasis. Therefore, targeting protein acetylation through modulation of SIRT7 activity could provide a potential new therapeutic approach to manage alterations of acid-base homeostasis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background Sirtuins are a family of seven NAD⁺-dependent deacetylases. Among sirtuins, SIRT7 has been recently shown to control important aspects of metabolism, cancer and bone formation. However, the molecular targets and functions of SIRT7 in the kidney are currently unknown. *In silico* analysis of kidney transcripts of the BXD murine genetic reference population revealed a positive correlation between *Sirt7* and *Slc12a7* mRNA expression, suggesting a link between the corresponding proteins that these transcripts encode, SIRT7 and the K-Cl cotransporter KCC4 respectively.

Methods We used *in vitro* models such a *Xenopus laevis* oocytes and HEK293 cells to evaluate the effect of SIRT7 on KCC4 acetylation, expression and activity. In addition, we used a mouse model of metabolic acidosis, total SIRT7-deficient mice and inducible renal tubule-specific SIRT7-deficient mice to evaluate the effect of SIRT7 on acid-base homeostasis.

Results Protein levels and activity of heterologously expressed KCC4 are significantly modulated depending on its acetylation status in *Xenopus laevis* oocytes. Moreover, SIRT7 interacts with KCC4 in a NAD⁺-dependent manner and increases its stability and activity in HEK293 cells. Interestingly, metabolic acidosis increased the expression levels of SIRT7 in kidney, as occurs with KCC4. In contrast, KCC4 expression is reduced in both total and inducible renal tubule-specific SIRT7-deficient mice. In addition, inducible renal tubule-specific SIRT7-deficient mice present mild renal tubular acidosis.

Conclusions Our data suggest that SIRT7 interacts and stabilizes KCC4 by modulating its activity through deacetylation and reveals a novel role for SIRT7 in renal acid-base homeostasis.

INTRODUCTION

Sirtuins (SIRT1-7) are a conserved protein family with seven members in mammals that differ in tissue expression, intracellular localization, enzymatic activity and target proteins (1). The main enzymatic activity of the sirtuins is NAD⁺-dependent protein deacetylation (2). Among the target proteins of the sirtuins are histones, several transcription factors, and a variety of enzymes involved in different cellular processes, such as proliferation, DNA repair, antioxidant activity, mitochondrial function and metabolism (3). The role of sirtuins in renal physiology has begun to be evaluated (4-6). For instance, SIRT1 controls eNOS activity in podocytes and represses the transcription of the epithelial sodium channel (ENaC) in collecting duct principal cells, decreasing sodium reabsorption and thus regulating sodium and water handling (7). Moreover, an increase in SIRT1 activity, through a boost on NAD⁺ production by inhibition of the α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase, enhances mitochondrial function and protects the kidney from acute injury (8). Similarly, SIRT3 maintains mitochondrial energy homeostasis and antioxidant defense in proximal and distal tubule compartments protecting against acute kidney injury (9). Although the kidney is one of the tissues that express the highest levels of *Sirt7* mRNA and protein (10), no role of SIRT7 has been described in renal physiology. SIRT7 regulates transcription through activation of RNA polymerase I (10), deacetylates lysine 18 of histone H3 via binding to the cancer-associated E26 transformed specific (ETS) transcription factor ELK4 (11), and desuccinylates lysine 122 of histone H3 promoting chromatin condensation and DNA double-strand breaks repair (12). SIRT7-deficient mice exhibit cardiac hypertrophy and inflammatory cardiomyopathy due to hyperacetylation of p53 and multisystemic mitochondrial dysfunction (13, 14). Furthermore, recent studies have described a role for SIRT7 in adipogenesis (15, 16), bone formation (17) and lipid metabolism (14, 18, 19). In fact, SIRT7 modulates mitochondrial function through the deacetylation of the transcription factor GABP β , a key regulator of the expression of mitochondrial proteins (14).

Notably, SIRT7-deficient mice display age-dependent hearing loss, suggesting a malfunction in ion transport in the ear (14). The hearing loss phenotype resembles that observed in mice lacking the K-Cl cotransporter KCC4 (20). KCC4 belongs to the SLC12 family of electroneutral cation-chloride-

Analysis of branched-chain amino acid metabolism and mTOR activation during macrophage polarization

CE

Armando R. Tovar¹, Nimbe Torres¹,
Noriega¹

CE

and Lilia G.

¹Depto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"; ²Depto. de Biomedicina Molecular, CINVESTAV, D.F., México.

Address Correspondence to:
Lilia G. Noriega
Av. Vasco de Quiroga No. 15
Col. Belisario Dominguez Sección XVI
Tlalpan, D.F.
CP.14080, Mexico
Tel. +52(55)55870900 ext 2809.

Ó

Running title:

BCAA and mTOR during macrophage polarization

ABSTRACT

Macrophages can be polarized to a proinflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype. During obesity, a switch from the M2 to the M1 phenotype is observed in adipose tissue. However, the mechanisms that trigger the switch to the M1 phenotype are only partially understood. In this study, we analyzed branched-chain amino acid (BCAA) metabolism and mTOR activation during macrophage polarization to provide further evidence on the metabolic pathways that are involved in this process. Our results demonstrate that M1 macrophages express higher levels of BCKDH and exhibit increased leucine oxidation and increased activation of mTORC1. In addition, we found that the increased BCAA concentrations did not alter macrophage polarization but reduced the autocrine anti-inflammatory response of the M1 macrophages. Finally, pharmacological inhibition of mTORC1 and mTORC2 decreased the expression of M1 and M2 macrophage marker genes. In conclusion, the M1 macrophages are able to metabolize BCAA at a higher rate than the M2 macrophages in the early stages of polarization, and mTORC1 activation plays an important role in the polarization towards the M1 phenotype.

Keywords:

Macrophages, Polarization, BCAA, mTOR, Immunometabolism

ABSTRACT

Macrophages can be polarized to a proinflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype. During obesity, a switch from the M2 to the M1 phenotype is observed in adipose tissue. However, the mechanisms that trigger the switch to the M1 phenotype are only partially understood. In this study, we analyzed branched-chain amino acid (BCAA) metabolism and mTOR activation during macrophage polarization to provide further evidence on the metabolic pathways that are involved in this process. Our results demonstrate that M1 macrophages express higher levels of BCKDH and exhibit increased leucine oxidation and increased activation of mTORC1. In addition, we found that the increased BCAA concentrations did not alter macrophage polarization but reduced the autocrine anti-inflammatory response of the M1 macrophages. Finally, pharmacological inhibition of mTORC1 and mTORC2 decreased the expression of M1 and M2 macrophage marker genes. In conclusion, the M1 macrophages are able to metabolize BCAA at a higher rate than the M2 macrophages in the early stages of polarization, and mTORC1 activation plays an important role in the polarization towards the M1 phenotype.

Keywords:

Macrophages, Polarization, BCAA, mTOR, Immunometabolism



ELSEVIER



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 59 (2018) 29–36

Journal of
Nutritional
Biochemistry

Interaction between leucine and palmitate catabolism in 3T3-L1 adipocytes and primary adipocytes from control and obese rats

Daniela Salinas-Rubio^a, Armando R. Tovar^a, Iván Torre-Villalvazo^a, Omar Granados-Portillo^a, Nimbe Torres^a, José Pedraza-Chaverri^b, Lilia G. Noriega^{a,*}

^aDepto. de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México, Mexico

^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Received 12 March 2018; received in revised form 14 May 2018; accepted 31 May 2018

Abstract

Metabolic profiling studies have highlighted increases in the plasma free fatty acid (FFA) and branched-chain amino acid (BCAA) concentrations, which are hallmarks of the obese and insulin-resistant phenotype. However, little is known about how the increase of the BCAA concentration modifies the metabolic fate of FFA, and *vice versa*, in adipocytes. Therefore, we incubated differentiated 3T3-L1 adipocytes or primary adipocytes from rats fed a control or a high-fat diet with: (1) 0, 250, 500 and 1000 μ M of leucine and determined the oxidation and incorporation of [1-¹⁴C]-palmitate into lipids or proteins or (2) 0, 250, 500 or 1000 μ M of palmitate and evaluated the oxidation and incorporation of [U-¹⁴C]-leucine into lipids or proteins. Leucine decreased palmitate oxidation and increased its incorporation into the lipid fraction in adipocytes; the latter was reduced in adipocytes from obese rats. However, palmitate increased leucine oxidation in adipocytes as well as reduced leucine incorporation into the protein and lipid fractions in adipocytes from obese rats. These results demonstrate that leucine modifies the metabolic fate of palmitate, and *vice versa*, in adipocytes and that the metabolic interaction between leucine and palmitate catabolism is altered in adipocytes from obese rats.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

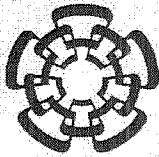
Keywords: Obesity; Metabolic fate; Adipocytes; BCAA

+52 55 55870900x2809; fax: +52 55 56553038.

E-mail address: lnoriegal@gmail.com. (L.G. Noriega).

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.05.011>
0955-2863/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

oxidation in C2C12 myotubes, demonstrating that increased BCAA catabolism enhances FFA oxidation [16].



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

APARTADO POSTAL 14-740

07300 MEXICO, D.F.

Copia del Acta, inscrita a fojas trece del Libro Centésimo Décimo Sexto, del Examen Final presentado por la C. [REDACTED] para obtener el grado de Maestra en Ciencias en la especialidad de Biomedicina Molecular.

En la Ciudad de México, a los veintiocho días del mes de agosto del año dos mil catorce, se reunieron en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, los señores: doctor Nicolás Villegas Sepúlveda, doctora María Carmen Sánchez Torres, doctor Vianney Francisco Ortiz Navarrete, todos ellos investigadores titulares del mencionado Departamento; y, como sinodal invitada por el Centro, la doctora Lilia Guadalupe Noriega López, Investigadora del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", a fin de efectuar el Examen Final que para obtener el grado de Maestra en Ciencias sustentó la C. Ana Elena Bunt Alatorre.

La C. [REDACTED] presentó la tesis titulada: "Análisis del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y de la activación de mTOR durante la polarización de los macrófagos", que fue desarrollada bajo la dirección de la doctora Lilia Guadalupe Noriega López y del doctor Vianney Francisco Ortiz Navarrete.

Con fundamento en los resultados de este examen, el Jurado dictaminó que la C. [REDACTED] aprobó el Examen Final para obtener el grado de Maestra en Ciencias en la especialidad de Biomedicina Molecular.

Nicolás Villegas Sepúlveda

María Carmen Sánchez Torres

Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Lilia Guadalupe Noriega López

El Director General del Centro certifica que las firmas que anteceden son auténticas.

José Pablo René Asomoza y Palacio



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE ENFERMERIA



6 de diciembre del 2012

LICENCIADA EN NUTRICIÓN

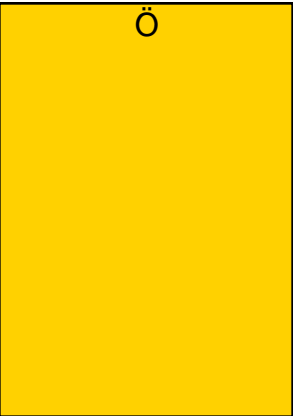
CE

Tengo el agrado de comunicarle que el Honorable Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad APROBÓ LA OBTENCIÓN DE SU TÍTULO DE LA CARRERA DE LICENCIATURA EN NUTRICIÓN, que sustentó Usted el día de la fecha, tuvo a bien:

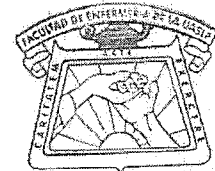
APROBARLA POR UNANIMIDAD DE VOTOS

Al comunicarle lo anterior, la felicito, hago votos por un completo éxito en el ejercicio de su profesión y al mismo tiempo

aprovecho la oportunidad para reiterarle las seguridades de mi más atenta y distinguida consideración.

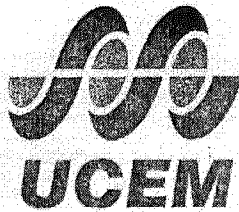


FACULTAD DE ENFERMERIA
SECRETARIA ESCOLAR



MSP. MA. *Guadalupe Guerrero Rosales*
GUADALUPE GUERRERO ROSALES
Secretaria Escolar

FACULTAD DE ENFERMERIA
SECRETARIA ESCOLAR



UNIVERSIDAD DEL CENTRO DE MÉXICO

ACTA DE EXAMEN PROFESIONAL

Acta Número:
34

En la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P.; siendo las 09:00
horas del día 24 del mes de mayo de 2013
se reunieron los miembros del jurado integrado por los señores:

DR. Jorge Alejandro Alegría Torres

LNB. Miriam Carolina Mendoza Capetillo

MTRA. Gabriela Pérez Flores

bajo la presidencia del primero y con carácter de secretario el último, para proceder a efectuar el examen correspondiente para obtener el título de:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

Con reconocimiento de validez oficial de estudios de la Secretaría de Educación de Gobierno del Estado de San Luis Potosí, según Acuerdo No. ES-08186, de fecha 12 de Febrero de 2008, que sustenta:

CE

Los miembros del jurado examinaron al sustentante y después de deliberar entre sí, resolvieron declararlo(a):

Aprobada por Unanimidad con Mención Honorífica

El presidente del jurado le dio a conocer el resultado y procedió a tomar la protesta de ley.

Ó
Firma del sustentante

Presidente

DR. Jorge Alejandro Alegría Torres

Vocal

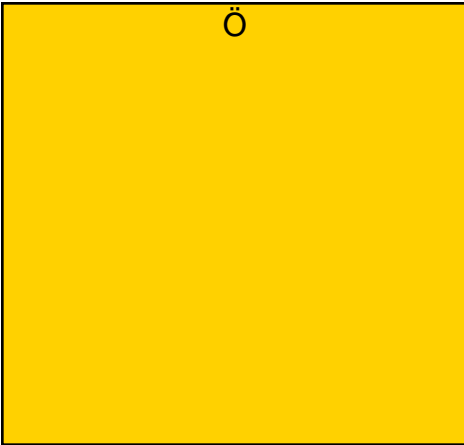
LNB. Miriam Carolina Mendoza Capetillo

Secretario

MTRA. Gabriela Pérez Flores

Rector

P. Gerardo Maya González



ACTA DE TITULACIÓN

En la ciudad de México D. F., a las 12:00 horas del día 9 del mes de AGOSTO de 2013.

Se reunieron los miembros del Jurado integrado por los señores:

DR. IVAN TORRE VILLALVAZO

DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LOPEZ

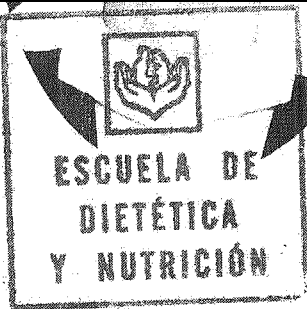
DR. VICTOR ORTIZ ORTEGA

bajo la presidencia del primero y con carácter de secretario el último para proceder a efectuar la evaluación de TRABAJO DE TITULACIÓN para obtener el título de LICENCIADO EN DIETÉTICA Y NUTRICIÓN, con reconocimiento de validez oficial de la SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA, según acuerdo No. 890052 de fecha 4 DE JULIO DE 1989 que sustenta:

CE

Los miembros del jurado examinaron al sustentante y después de deliberar entre sí, resolvieron declararlo(a) APROBADO.

El presidente del Jurado le dio a conocer el resultado y procedió a tomar la protesta de ley.



[Handwritten signature of Dr. Ivan Torre Villalvazo]

DR. IVAN TORRE VILLALVAZO
PRESIDENTE

[Handwritten signature of Dr. Victor Ortiz Ortega]

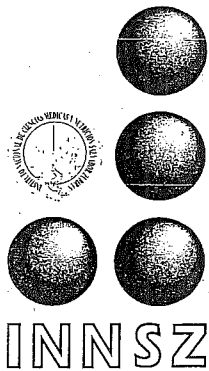
DR. VICTOR ORTIZ ORTEGA
SECRETARIO

[Handwritten signature of Dra. Lilia Guadalupe Noriega Lopez]

DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LOPEZ
VOCAL

VoBo

[Handwritten signature of M.E. Luz Elena Pale Montero]
M.E. LUZ ELENA PALE MONTERO
DIRECTORA



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Abril 23, 2012

Dra. Lilia G. Noriega López
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: "Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad".

Registro CINVA: 529

Clave: FNU-529-12/16-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA), revisó su respuesta a las observaciones emitidas por esta Comisión y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

MVZ., M. Sc, Cert. L.A.M. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ., M.en C. Octavio Villanueva Sánchez .Secretario de la Comisión de
Investigación en Animales
MVZ.M.en C. Ma. de la Luz Streber J.- Comisión de Investigación en Animales
Dra. Nimbe Torres y Torres.- Comisión de Investigación en Animales

Investigación

Tradición Servicio

Asistencia Docencia

20007700

Recibí
el 23/04/12
30/04/12

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

(1403)



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

No invada las zonas sombreadas

FECHA DE RECEPCIÓN : 2011-11-24

CLAVE: FNU - 529 - 12 / 15 - 1

TÍTULO: Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Lilia Guadalupe Noriega López

DEPARTAMENTO O SERVICIO: Fisiología de la Nutrición

TIPO DE INVESTIGACIÓN:

| |
|-------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> |

1. Investigación Clínica
2. Investigación Experimental
3. Investigación Documental
4. Desarrollo Tecnológico
5. Investigación Epidemiológica
6. Otros

(incluye seres humanos o sus productos biológicos)
 (incluye animales de investigación o sus productos biológicos)
 (revisión de expedientes, revisión bibliográfica, informe de casos, etc.)
 (instrumental, equipo, métodos diagnósticos, drogas nuevas, etc.)
 (estudios en poblaciones, en comunidad o en hospital)
 (organización de eventos, asistencia a reuniones, donativos, etc.)

PATROCINADORES:
CONACYT

| | |
|--------------|---------|
| Cantidad: | 1269932 |
| TOTAL | |

Fondo de Apoyo

PERIODO DE UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS: de mes: 01 año: 2012 a mes: 01 año: 2015

FORMA EN LA QUE SE RECIBIRÁN LOS FONDOS:

| | | | | |
|--------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Primer año: | 828932 | | | |
| Segundo año: | 268000 | | | |
| Tercer año: | 173000 | | | |
| Cuarto año: | | | | |
| Quinto año: | | | | |
| | primer trimestre | segundo trimestre | tercer trimestre | cuarto trimestre |

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN
(ver instrucciones al reverso)

| | |
|---|----------------|
| 1. Personal: (sueldos y sobresueldos al personal) | |
| 2. Equipos: (de laboratorio, cómputo, transporte, etc.) | 535692 |
| 3. Materiales: (reactivos, consumibles, desechables, etc.) | 610920 |
| 4. Animales: (adquisición, cuidado, procedimientos, etc.) | 36320 |
| 5. Estudios: (de laboratorio, gabinete, especiales, etc.) | |
| 6. Viáticos: (reuniones científicas y trabajo de campo) | 36000 |
| 7. Publicaciones: (costos directos de publicación, sobreliros) | 25000 |
| 8. Suscripción: (libros, revistas, software, periódico, etc.) | 26000 |
| 9. Varios: (teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc.) | |
| 10. Fondo de Apoyo: (15% de la cantidad total del proyecto) | |
| TOTAL: | 1269932 |

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

| |
|--|
| |
| |

FIRMAS

| |
|----------------------------------|
| Ó |
| 107-05-12 Fecha de Resolución |



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE
EVALUACIÓN DE
PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIBH: FNU-S29-12/16-1

| | | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------|-----------------|------------|
| 1. Título del proyecto | | | | |
| Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad | | | | |
| 2. Investigadores | | | | |
| 2a. Identificación | | | | |
| INVESTIGADOR | Posición institucional | Posición en el proyecto | Teléfono (ext.) | Correo-E |
| NORIEGA LOPEZ LILIA GUADALUPE | INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C | Investigador responsable | | [REDACTED] |
| ORDAZ NAVA GUILLERMO | QUIMICO A | Investigador asociado | | |
| TORRES Y TORRES NIMBE | INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F | Investigador asociado | | [REDACTED] |
| 2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto | | | | |
| 3. Instituciones participantes | | | | |
| 4. Patrocinio | | | | |
| 4a. Organismos patrocinadores | | | | |
| - CONACYT | | | | |
| 4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación. | | | | |
| 5. Marco teórico | | | | |
| ANTECEDENTES: 1. Obesidad: La obesidad es el resultado de un balance energético positivo donde la energía que se ingiere sobrepasa el gasto energético. Hoy en día, este desequilibrio energético es ampliamente favorecido por un suministro abundante de alimentos y un estilo de vida sedentario [1]. La obesidad representa un problema de salud pública ya que es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares [2]. En nuestro país el 70% de la población entre los 30 y 60 años cursa con sobrepeso y obesidad [3], causando más de 200,000 muertes anuales y un incremento significativo en los costos de la asistencia médica [4]. A pesar de múltiples investigaciones, la patogénesis de la | | | | |

obesidad humana no ha sido completamente esclarecida y su prevención y tratamiento son todavía complicados [5].

Durante la obesidad se presenta una alteración en los efectos biológicos de la insulina, hormona encargada de regular el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en el hígado, músculo y tejido adiposo [6]. Dicha alteración es conocida como resistencia a insulina. La resistencia a la insulina es una condición patológica que se origina por el acumulo de metabolitos de ácidos grasos como los diacilgliceroles y las ceramidas en músculo esquelético. Este incremento es el resultado de una oxidación ineficiente de los ácidos grasos en la mitocondria [7]. La resistencia a la insulina conduce a una elevada hidrólisis de los triglicéridos por el tejido adiposo que ocasiona un incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos [8]; en músculo, reduce la captura de glucosa [9]; y en hígado, causa una síntesis deficiente de glucógeno, una producción alterada de glucosa y un incremento en la síntesis de triglicéridos y proteínas [10]. En conjunto, estas alteraciones dan lugar a importantes anormalidades como son la hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y esteatosis hepática [11].

La esteatosis hepática es el resultado del incremento en la síntesis de triglicéridos y de la disminución en la oxidación de los ácidos grasos en mitocondria. A nivel molecular, la acumulación de triglicéridos esta mediada por un incremento en la expresión de los factores de transcripción lipogénicos como el SREBP1c y de las enzimas que median la formación de triglicéridos como son la sintasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la estearil-CoA desaturasa (SCD1) y la Glicerol-fosfato acil transferasa (GPAT) [12]. Por el contrario, la disminución en la oxidación de ácidos grasos esta asociada a una disminución la expresión del factor de transcripción PPAR (Receptor activado por proliferados de peroxisomas)-alfa y de las enzimas carnitina-palmitoil transferasa (CPT1), la deshidrogenasa de grupos acil de cadena larga (LCAD) y la acetil-CoA oxidasa (ACO), [13]. De manera interesante, el análisis de la expresión de la CPT1 en el hígado de 41 cepas de ratones pertenecientes a la población de referencia genética BXD demostró una correlación inversa a la expresión de la enzima isovaleril CoA deshidrogenasa (IVDH). La IVDH es una enzima mitocondrial involucrada en el catabolismo oxidativo de la leucina, un aminoácido de cadena ramificada. Dado que el grado de expresión de la CPT1 y de IVDH son indicativos del nivel de oxidación de sus respectivos substratos por la mitocondria, la correlación inversa entre estas dos enzimas sugiere que una mayor oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada disminuye la oxidación de los ácidos grasos. El presente trabajo pretende evaluar dicha interacción para lo que a continuación se brinda un panorama general del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

2. Amino ácidos de cadena ramificada:

Los aminoácidos de cadena ramificada, o BCAA por sus siglas en ingles, son la leucina, isoleucina y valina [14]. Estos aminoácidos conforman del 20 al 25% de la mayoría de las proteínas dietarias y se encuentran entre los nueve aminoácidos indispensables para los humanos [15]. Los BCAA son utilizados principalmente para la síntesis de proteínas y al no existir una reserva especial para ser almacenados, el exceso es metabolizado para ser eliminado [16]. El nitrógeno es eliminado vía transaminación, desaminación, y formación de urea; y los esqueletos de carbono se conservan generalmente como hidratos de carbono vía gluconeogénesis (AA glucogénicos), o como ácidos grasos vía síntesis del ácido graso (AA cetogénicos).

Los primeros pasos en el catabolismo de los BCAA son comunes para los tres aminoácidos e involucra a dos complejos enzimáticos: 1) la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) que da lugar a los α -cetoácidos de cadena ramificada [17]; y 2) la deshidrogenasa de los α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKD) que dan lugar a los ésteres de CoA de cadena ramificada [18]. El metabolismo posterior diverge existiendo una vía en particular para cada uno de los ésteres de CoA hasta que son incorporados al ciclo de Krebs o dan lugar a los cuerpos cetónicos [19]. Es importante mencionar que los ésteres de CoA de cadena ramificada pueden reaccionar con la L-carnitina produciendo acil-carnitinas de cadena ramificada de las cuales se desconoce si influyen en el metabolismo celular [20].

A nivel molecular, los BCAA son capaces de regular varios procesos como la síntesis de proteínas, la secreción de insulina y la captura de aminoácidos por el cerebro. Por ejemplo, la leucina estimula la síntesis e inhibe la degradación de proteína en situaciones de abundancia de nutrimentos [21, 22]. La estimulación de la síntesis de proteína por la leucina esta ligada a la activación de la vía de señalización del complejo blanco de la rampamicina de mamíferos 1 (mTORC1 por sus siglas en inglés) la cual involucra la fosforilación de S6K1, S6, 4EBP1, y eIF4B [23].

3. El papel de los BCAA durante la obesidad:

Actualmente existe una gran controversia con respecto al papel que los BCAA juegan en el desarrollo de la obesidad. La leucina es el BCAA que mas ha sido estudiado en este contexto [24]. Por ejemplo, la leucina se ha asociado con el control de la saciedad, el peso corporal y el gasto energético. La leucina estimula directamente la vía de señalización de mTOR en el hipotálamo dando lugar a una disminución en la ingesta de alimento [25]. También es capaz de influenciar la saciedad estimulando la secreción de leptina [26]. Por otro lado, suplementos dietarios de leucina han demostrado ser capaces de disminuir la masa grasa y el peso corporal y mejorar el metabolismo de la glucosa en algunos casos [24, 27-31]. Es muy importante tener en cuenta que en la mayoría de estos estudios el efecto de la leucina se determino en un contexto de estrés energético originado ya sea por restricción calórica o ante la realización habitual de ejercicio, que generalmente no es el caso en pacientes obesos. Paradójicamente, otros estudios no apoyan la teoría del papel antiobesidad de los BCAA. Por ejemplo, existe evidencia de que las concentraciones de BCAA se encuentran elevadas en humanos obesos y en modelos animales de obesidad [32-34]. También se ha demostrado que durante una sobrealimentación, incluyendo un exceso en el consumo de leucina, la hiperactivación de la señalización de TORC1, es capaz de agravar la resistencia a la insulina disminuyendo la fosforilación de AKT y aumentando la fosforilación de la serina 307 del sustrato del receptor de insulina (IRS1) inactivando su señalización posterior [35-37].

Un estudio reciente en el que se comparo una amplia gama de metabolitos cuantificados en el plasma de sujetos delgados y obesos, mostró que además del incremento en las concentraciones de los BCAA, el perfil de los sujetos obesos esta caracterizado por un incremento significativo en las concentraciones de las acil-carnitinas derivadas de los BCAA [38]. Interesantemente, el incremento en las acil-carnitinas mostró un correlación directamente proporcional con el grado de resistencia a la insulina en los sujetos obesos.

Estudios en animales realizados en base a estos hallazgos demostraron que suplementar una dieta alta en grasa con BCAA en efecto disminuye el consumo de energía y el peso corporal, pero no ocasiona ninguna diferencia en el grado de resistencia a la insulina. Asimismo, los animales que recibieron la dieta alta en grasa suplementada con BCAA presentaron los niveles más altos de las acilcarnitinas [38]. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que las acilcarnitinas de los BCAA son capaces de competir con los ácidos grasos y el piruvato para su oxidación [39], probablemente estimulando la lipogénesis. En conjunto estos resultados sugieren que en situaciones de sobrealimentación, el aumento de los BCAA circulantes son desviados hacia vías catabólicas y que los metabolitos intermediarios de este catabolismo pudieran estar involucrados con la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos incrementando su acumulación en tejidos como hígado y músculo esquelético, lo cual contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. En apoyo a esta teoría, She y colaboradores demostraron como ratones con una deficiencia de la BCAT presentaban concentraciones considerablemente elevadas de los BCAA lo cual se asoció con un incremento en el consumo de alimento. De manera interesante, estos animales eran resistentes al desarrollo de obesidad inducida por dieta y no presentaban resistencia a la insulina ni intolerancia a la glucosa [40]. La deficiencia de la BCAT en estos animales, bloqueó por completo el catabolismo de los BCAA impidiendo la producción de metabolitos intermediarios como las acilcarnitinas. Se ha demostrado *in vitro* que el catabolismo de la leucina es necesario para inhibir la proteólisis [41] y en particular que la isovaleril-carnitina derivada del catabolismo de la leucina es capaz de inhibir eficientemente este proceso [42]. Una proteólisis perpetua en los animales deficientes de BCAT contribuye a un ciclo proteico donde solo se sintetiza proteína, proceso que consume grandes cantidades de energía. De este modo, el incremento en el consumo de energía y la resistencia al desarrollo de la obesidad inducida por dieta de los animales deficientes de BCAT es probablemente debido a altos niveles de oxidación de glucosa y ácidos grasos para cubrir los requerimientos de ATP para mantener este ciclo fútil de síntesis y degradación de proteínas.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Las acil-carnitinas derivadas de los aminoácidos de cadena ramificada se encuentran incrementadas en pacientes obesos y presentan una correlación positiva con el desarrollo de resistencia a insulina. Se desconoce si el incremento en la concentración de las acil-carnitinas es responsable del desarrollo de resistencia a la insulina a través de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos en el tejido hepático. El presente proyecto pretende dar respuesta a dicha interrogante.

JUSTIFICACION :

La obesidad es un problema de salud pública que afecta al 70% de la población entre los 30 y 60 años de

nuestro país, causando más de 200,000 muertes anuales y un incremento significativo en los costos de la asistencia médica. Una de las principales alteraciones metabólicas que se presenta durante la obesidad es la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es el resultado de la acumulación de diacilgliceroles y ceramidas producto de la oxidación incompleta de los ácidos grasos. La oxidación de los ácidos grasos se lleva a cabo en la mitocondria y la tasa de oxidación es determinada por la carnitina palmitoil transferasa (CPT1), enzima que regula la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria. El análisis de la expresión de la CPT1 en el hígado de 41 cepas de ratones pertenecientes a la población de referencia genética BXD demostró una correlación inversa a la expresión de la enzima isovaleril CoA deshidrogenasa (IVDH). La IVDH es una enzima mitocondrial involucrada en el catabolismo oxidativo de la leucina, un aminoácido de cadena ramificada. Dado que el grado de expresión de la CPT1 y de IVDH son indicativos del nivel de oxidación de sus respectivos sustratos por la mitocondria, la correlación inversa entre estas dos enzimas sugiere que una mayor oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada disminuye la oxidación de los ácidos grasos. Esta hipótesis es sustentada por un estudio reciente en el que se demostró cómo pacientes obesos presentan un mayor catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada el cual se ve asociado con el grado de resistencia a la insulina que presentan los sujetos. Con la realización de este proyecto se pretende evaluar si la isovaleril-carnitina (carnitina derivada del catabolismo oxidativo de la leucina) disminuye la oxidación de ácidos grasos e incrementa la síntesis de triglicéridos, si modifica la síntesis/degradación de proteínas en hígado y músculo esquelético y con ello la resistencia a la insulina de ratones con obesidad inducida por dieta, en ratones deficientes de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) y en cultivo primario de hepatocitos. Para ello se evaluará el efecto in vivo de la suplementación en la dieta con isovaleril-carnitina en ratones con obesidad inducida por dieta sobre el consumo de alimento y la ganancia de peso, el gasto energético y la tolerancia a la glucosa, el perfil bioquímico y hormonal, el contenido de lípidos en hígado, la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y en la síntesis de triglicéridos, el contenido y estado de fosforilación de proteínas involucradas en la síntesis/degradación de proteínas y en la cascada de señalización de la insulina, la tasa de síntesis y degradación de proteínas y la resistencia a la insulina en ratones con obesidad inducida por dieta mediante un clamp euglicémico-hiperinsulinémico y análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina en hígado y músculo esquelético. También evaluaremos si la isovaleril-carnitina dietaria es capaz de inducir obesidad en ratones deficientes de BCAT alimentados con dieta alta en grasa y por último, se determinará el efecto in vitro de la isovaleril-carnitina en cultivos primarios de hepatocitos sobre la oxidación de ácidos grasos, la síntesis y contenido de triglicéridos y la fosforilación de las proteínas mediadores de la síntesis de proteína. Al final del proyecto conoceremos si la isovaleril-carnitina es capaz de modificar el metabolismo de lípidos y la síntesis/degradación de proteínas durante la obesidad, con el fin de establecer a las acil-carnitinas, como un importante blanco farmacológico en el tratamiento de la obesidad.

6a. Hipótesis

Las acil-carnitinas derivadas de los aminoácidos de cadena ramificada son capaces de alterar in vivo el ciclo proteico inhibiendo la degradación de proteínas. Asimismo, son capaces de inhibir la oxidación de los ácidos grasos estimulando la síntesis de triglicéridos. Estos cambios metabólicos contribuyen de manera importante al desarrollo de resistencia a la insulina mediada por lípidos durante la obesidad. Si esto es cierto, el diseño de Estrategias farmacológicas que incrementen la degradación de las acil-carnitinas o eviten su producción representarían una importante alternativa en el tratamiento de la obesidad.

6b. Objetivos.

Determinar el efecto de la isovaleril-carnitina (carnitina derivada del catabolismo de la leucina) sobre el metabolismo de lípidos y la síntesis/degradación de proteínas en hígado y músculo esquelético de ratones con obesidad inducida por dieta, en ratones deficientes de BCAT y en cultivo primario de hepatocitos.

7. Metodología: Diseño general.

a) Diseño del estudio: Controlado.

b) Descripción de la maniobra o intervención:

1. Para evaluar el efecto *in vivo* de la isovaleril-carnitina se seguirá el siguiente protocolo:

Modelo animal: Se utilizarán 120 ratones C57B6 macho de 20-40 gramos, los cuales serán producidos y alojados en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ). La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 será de 40 a 70%, la temperatura de 18 a 26°C y ciclos de luz/oscuridad de 12h cada uno y ciclos de ventilación de más de 15 cambios por hora. Los animales se mantendrán en microaisladores individualmente ventiladas por extracción de aire con cama de viruta de madera a una densidad de no más de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua. Se realizará un estudio preliminar con 20 ratones para determinar la vía de administración y la dosis adecuada de isovaleril-carnitina para obtener los valores observados en pacientes obesos. La concentración plasmática de isovaleril-carnitina se determinará en colaboración y como fue descrito por Newgard y col. [38]. Una vez establecidas la dosis y la vía de administración, los ratones restantes se dividirán en 4 grupos experimentales de 25 ratones cada uno. Al grupo 1 se les suministrará una dieta control con 5% de lípidos, el grupo 2 recibirá una dieta control e isovaleril-carnitina, el grupo 3 tendrá una dieta alta en grasa con 60% de calorías provenientes de lípidos, y finalmente el grupo 4 recibirá dieta alta en grasa e isovaleril-carnitina. Las dietas serán preparadas de acuerdo a lo que se menciona en el inciso e) grupos de tratamiento.

Evaluación del fenotipo metabólico: El estudio tendrá una duración de 10 semanas, tiempo necesario para que los ratones alimentados con las dietas altas en grasa alcancen una ganancia de peso 40% mayor a los ratones alimentados con las dietas control. Durante este periodo se registrará dos veces por semana la ganancia de peso y el consumo de alimento. Posteriormente se realizarán las siguientes pruebas fisiológicas:

i. Evaluación del gasto energético:

El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta (Oxymax, Columbus Instrumens, equipo de reciente adquisición en el departamento). Los animales serán colocados en una cámara con un flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO₂ serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de oxígeno y el coeficiente de respiración (RQ).

ii. Valoración de la tolerancia a la glucosa:

Se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa en 10 ratones de cada grupo. Los animales serán inyectados vía IP con una solución de glucosa al 20% a una concentración de 2.0 mg/g del peso corporal y la glucosa sanguínea será evaluada a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Se colectará aproximadamente 100µl de sangre en cada punto para determinar la concentración de insulina plasmática.

c. Obtención de muestras y tejidos:

Se practicará eutanasia por hipoxia cerebral inducida con dióxido de carbono. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, los gases nitrógeno y argón, al igual que el dióxido de carbono son eutanásicos, no anestésicos, los cuales producen hipoxia cerebral y consecuente inconciencia. Se llevará a cabo exanguinación a través de la vena porta una vez que se haya cerciorado de la pérdida total de los

reflejos vitales del animal. La fuente de dióxido de carbono es un cilindro de gas comprimido y se liberará en una pequeña cámara cerrada, pues se desea obtener tejidos que no tengan contaminación química que alteren los resultados de nuestras determinaciones. La exanguinación se realizará por la vía porta ya que asegura la obtención de un volumen adecuado de sangre para la determinación de diferentes parámetros químicos y hormonales, ya que según la norma mencionada es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libres de contaminación química y/o tejido cerebral íntegro.

De esta manera, una vez realizadas las pruebas fisiológicas, los animales serán sometidos a un ayuno de 4 horas para la eutanasia. Se obtendrá el volumen total de sangre, del cual se separará el suero por centrifugación y se almacenará a -80°C para futuras determinaciones. Posteriormente, se obtendrán muestras de hígado y músculo esquelético mediante una excisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C . En las muestras obtenidas se realizarán los estudios siguientes:

i. Perfil bioquímico y hormonal:

Se evaluará la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, albúmina, urea y creatinina en suero utilizando ensayos enzimáticos-imétrico (Cobas C111, Roche). La concentración de insulina, glucagón, leptina, y adiponectina será determinada por radioinmunoensayo (Linco).

ii. Contenido lipídico en hígado:

Se extraerán los lípidos totales de acuerdo al método de Folch, el cual se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogenizado en una solución solvente que al añadir agua y centrifugar forma dos fases. En la fase acuosa se encuentran los compuestos hidrofílicos y en la superior se encuentra la fase orgánica que contiene los lípidos. Se evapora para concentrar el contenido de lípidos en el fondo del tubo. La pastilla lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10%. Finalmente, se determina la concentración de triglicéridos en el extracto por los métodos anteriormente mencionados.

iii. Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de triglicéridos y en la oxidación de ácidos grasos:

Se obtendrá el mRNA total de muestras de hígado y músculo esquelético con TRIzol, utilizando el método descrito por el proveedor. Este método consiste en una digestión con TRIzol, seguida de una extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol. La expresión de SREBP1c, ACC, FAS, SCD1, GPAT, PPAR α , CPT1, LCAD, y ACO se cuantificará por PCR en tiempo real usando ensayos fluorogénicos TaqMan de Applied Biosystems (AB), en un equipo ABI prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (AB, User Bulletin no.2). La reacción se llevará a cabo usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR Master Mix, AB), preparando reacciones sin RNA paralelamente a las muestras como control. Las muestras se correrán por triplicado. Los valores obtenidos se normalizarán dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural (18S) en cada reacción.

iv. Análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas y en la cascada de señalización de la insulina.

Se obtendrán proteínas totales de muestras de hígado y músculo y se analizará la cantidad de mTOR, S6KI, eIF2, AKT e IRS1 fosforilada por medio de western-blot como se ha descrito [44]. Brevemente, se determinará la concentración de proteínas en el extracto total por medio del estuche para análisis de proteínas DC (Bio-Rad). Cantidades equivalentes de cada muestra serán cargadas para electroforesis en SDS-

PAGE y transferidas a membranas de PVDF (Amersham). Las membranas se bloquean incubándolas en leche descremada al 0.4% e incubación por 12h con el anticuerpo primario a 4°C. Se utilizará β -actina como control de carga. Finalmente las membranas se incubarán con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 45 min y las bandas se visualizarán con un reactivo quimioluminiscente (Visualizer Spray and Glow, Santa Cruz).

d. Tasa de síntesis y degradación de proteínas:

Para determinar el efecto de la isovaleril-carnitina sobre el ciclo proteico se analizará la tasa de síntesis de proteína evaluando la incorporación de ^3H fenilalanina a proteína como se describió anteriormente [40]. Para esto 10 animales de los cuatro grupos serán inyectados con ^3H -fenilalanina y 15 minutos después se realizará la eutanasia como se describió anteriormente para colectar la sangre y muestras de los órganos. Para evaluar la tasa de degradación de proteína se determinará la creatinina urinaria y la 3-metilhistidina, ambos indicativos de la degradación de proteínas miofibrilares.

2. Para evaluar si las acil-carnitinas son capaces de inducir obesidad en ratones deficientes de BCAT alimentados con una dieta alta en grasa se seguirá el siguiente protocolo:

Modelo animal: Se utilizarán 90 ratones macho de aproximadamente 20g, de los cuales 45 serán deficientes para la BCAT y 45 serán controles. Los animales serán obtenidos a través de una colaboración con el Dr. Christopher J. Lynch de la Universidad de Pensilvania (Pennsylvania, USA). Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran como se describió anteriormente y serán divididos en tres grupos experimentales: el Grupo 1 que recibirá la dieta control, el Grupo 2 que recibirá una dieta con 60% de contenido en lípidos, y el grupo 3 que recibirá una dieta alta en grasa e isovaleril carnitina. Cada uno de los grupos estará conformado por 15 ratones controles y 15 ratones deficientes de BCAT.

Evaluación del fenotipo metabólico: Al igual que en el inciso anterior el estudio tendrá una duración de 10 semanas. Durante este periodo se registrará dos veces por semana la ganancia de peso y el consumo de alimento. Posteriormente se realizarán las pruebas fisiológicas que se describieron en el inciso anterior.

3. Para evaluar si la isovaleril-carnitina tiene un efecto directo sobre la resistencia a la insulina se realizará un clamp euglicémico-hiperinsulinémico en ratones alimentados con una dieta suplementada con isovaleril-carnitina siguiendo el siguiente protocolo:

Se utilizarán 20 ratones C57B6 de aproximadamente 30g los cuales se dividirán en dos grupos. Estos estudios requieren de una vía que nos permita infundir de manera continua durante 2 horas soluciones de insulina, glucosa e isovaleril-carnitina. Por otro lado, también es necesaria una vía que nos permita obtener cada 5 minutos una muestra sanguínea de por lo menos 30 μl por dos horas. Las vías elegidas para tal objetivo la vena yugular y la vena caudal. Por lo que para realizar este estudio, los ratones serán sometidos a una cirugía donde se canularán la vena yugular. El material utilizado será silastic acoplado a un cateter para venopunción del No 20, esterilizados a gas, el instrumental quirúrgico y el material de sutura (seda 6 y 3 ceros) serán provistos de manera estéril por el departamento de cirugía experimental. Los animales sin ayuno previo se anestésarán con 90 mg/Kg de ketamina y 10 mg/Kg de xilacina de manera intraperitoneal. Se rasura el área ventral y dorsal del cuello. Se realiza una pequeña

incisión en ambos lugares, de la parte dorsal del cuello se abre surco intradérmico del lado derecho hasta la incisión en la zona ventral del cuello y a través de ellos se introduce una cánula previamente llena con una solución de heparina de 100 U/ml en NaCl al 0.9% estéril. Una vez que la cánula se encuentran dentro se procede a disecar la vena yugular colocando en cada uno de los extremos hilo quirúrgico para bloquear el flujo sanguíneo, una vez realizado esto se realiza una pequeña incisión y con ayuda de unas pinzas de punta fina se introduce la cánula. Una vez dentro del vaso la cánula es fijada realizando un nudo con cada uno de los hilos quirúrgicos. Para terminar se procede a suturar cada una de las incisiones fijando perfectamente con hilo quirúrgico los extremos de cada una de las cánulas en la cabeza del animal. Para evitar que el animal se retire la cánula, esta será fijada en un pequeño catéter que será fijado de manera intradérmico en la parte posterior del animal. Los cuidados postoperatorios incluyen: utilizar una bolsa de agua caliente cerca del raton para evitar hipotermia; administrar de manera intramuscular 30 mg/Kg de metamizol y 5 mg/Kg de enrofloxacin, de manera subcutánea 1000U/Kg de heparina cada 24h; lavar la cánula con solución de heparina por lo menos una vez al día, administrar por vía oral de 40 a 80 ml/Kg de solución salina 0.9%. Se le permitirá al animal recuperarse de la cirugía de 5 a 6 días. Transcurrido este tiempo se realiza cada uno de los clamps de acuerdo a lo descrito por DeFronzo y col. El estudio será terminado para aquellos ratones que presenten dolor extremo, falta de movimiento, pérdida de peso, falla de la canula intrayugular.

Para realizar el clamp euglicémico, la cánula colocada en la yugular se conectara a una vía de dos pasos. Uno de los pasos estará conectado a una tubería proveniente de una bomba de infusión que administrara de manera constante una solución de insulina a una velocidad de 100mU/Kg/min en conjunto con una solución vehiculo (Grupo 1) o una solución con isovaleril-carnitina. La solución de insulina mantendrá los niveles de insulina plasmáticos a aproximadamente 40mU/L por 2 horas. La elevación de la concentración de insulina genera un decremento en los niveles de glucosa sérica, la disminución en la concentración de glucosa puede ser modificada por la infusión de la isovaleril-carnitina. Los niveles de glucosa se mantendrán en 100 mg/dl (euglicemia) administrando de manera variable una solución de glucosa al 20% por el otro paso de la vía colocada en la cánula. Para mantener la euglicemia, se obtendrán muestras sanguíneas de la vena caudal cada 5 min en las que se le determinara inmediatamente la concentración de glucosa para que con este dato se pudiera modificar el rango de infusión de la glucosa. El rango de infusión de glucosa durante la última hora del clamp se tomó como un parámetro de respuesta que indica la sensibilidad a la insulina. Al termino del experimento se tomaran muestras de tejidos como se menciona anteriormente para evaluar la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de insulina.

4. Para evaluar el efecto *in vitro* de isovaleril-carnitina en el metabolismo lípidico y en la síntesis/degradación de proteínas se seguirá el siguiente protocolo:

Cultivo primario de hepatocitos: Se obtendrán hepatocitos de 10 ratas Sprague-Dawley macho provenientes del bioterio del INCMNSZ de 6 semanas como lo describe Sacci [43]. Brevemente, las ratas serán anestesiadas con ketamina y xilacina por posteriormente extraer el hígado el cual será perfundido y digerido con colagenasa. Las células se cultivarán en pozos de 3 cm² a una densidad de 6000 células/cm² en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico (Roche). Los hepatocitos primarios serán incubados con las concentraciones de isovaleril-carnitina

encontradas en sujetos delgados y obesos [38]. Se realizara una curva tiempo respuesta para evaluar el efecto de la isovaleril-carnitina en los diferentes parámetros que se describen a continuación:

i. Análisis de la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos:

Después de transcurrido el tiempo respectivo de incubación, se obtendrá el RNA de los hepatocitos. El análisis del contenido de mRNA de PPAR alfa, CPT1, LCAD, y ACO se realizará como se describió anteriormente.

ii. Oxidación de palmitato:

Para evaluar el efecto de la isovaleril-carnitina sobre la oxidación de los ácidos grasos, los hepatocitos tratados con isovalerilcarnitina serán incubados por 1 hora con palmitato marcado con ^{14}C . La tasa de oxidación de palmitato se determinará cuantificando la producción de $^{14}\text{CO}_2$. Para cuantificar el $^{14}\text{CO}_2$, se empleara un tubo en T unido a viales de líquido de centelleo que contendrá una mezcla de etanolamina:metilcelosolve que funciona como trampa de CO_2 . Los tubos serán cuantificados utilizando un contador de partículas beta.

iii. Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de triglicéridos:

El contenido de SREBP1c, ACC, FAS, SCD1 y GPAT será evaluado como se describió anteriormente.

iv. Análisis del contenido de triglicéridos en los hepatocitos primarios:

Se utilizará la tinción rojo oleoso para evaluar el contenido de triglicéridos en hepatocitos tratados con isovaleril-carnitina. Los hepatocitos se fijaran con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min. Y se teñirán con la solución de rojo oleoso por 2 h a temperatura ambiente. Se tomaran fotografías de las células bajo el microscopio. Para un análisis cuantitativo del contenido celular de triglicéridos, las células se lavaran con PBS y se recolectaran por raspado utilizando 50mM Tris-HCl (pH 7.5) con 1mM EDTA. Las células serán sónicas por 5s a 40W y centrifugadas a 13,000g por 5 min. a 48°C. Los sobrenadantes serán utilizados para cuantificar los triglicéridos por medio de un ensayo enzimático-imétrico (DiaSys Diagnostic Systems GMBH, Holzheim, Alemania).

v. Análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas:

Se determinará la cantidad de mTOR, S6KI y eIF2 fosforilada por medio de western-blot en extractos totales de los hepatocitos tratados con isovaleril-carnitina como se describió anteriormente.

5. Análisis estadístico:

Los resultados se presentarán como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Los datos con una distribución variable se transformarán logarítmicamente antes de su análisis. Los datos serán evaluados usando un análisis de varianza de una vía y cuando la interacción resulte significativa se realizará la prueba PLSD de Fisher. Las diferencias se considerarán significativas con una p

c) Tamaño de muestra: En la descripción de la maniobra o intervención se describe el numero de animales a utilizar dependiendo de cada objetivo. Este numero se determino según la ecuación de muestras independientes: $n=2S^2(Z\alpha+Z\beta)^2/\Delta^2$. En donde: S=

Desviación estándar. Se utilizaron datos obtenidos en un estudio previo realizado en el Departamento de Fisiología de la Nutrición usando la concentración de colesterol en suero en ratones control y alimentados con una dieta alta en colesterol (2%) con un valor de ± 39 mg/dl. Δ = Diferencia mínima entre la concentración de colesterol en suero esperada entre los grupos control y los alimentados con una dieta alta en colesterol con un valor de 60 mg/dl. α = tasa de error 0.05. β =Poder de la prueba 0.8. $Z\alpha+Z\beta=1.96+0.84$ constantes. Por lo tanto: $n=2(39)^2(1.96+0.84)^2/(60)^2$, $n\geq 6.6$. Con base a lo anterior se necesita utilizar un número promedio de 7 ratones por grupo. Utilizaremos 10 ratones por grupo para tomar en cuenta los ratones que pudieran ser excluidos del estudio por razones técnicas o por alguno de los procedimientos.

d) Mecanismos de asignación del tratamiento: Los animales se dividirán de acuerdo a lo establecido en la descripción de la maniobra o intervención. La distribución se hará de manera aleatoria.

e) Grupos de tratamiento: Los grupos se encuentran descritos en la descripción de la maniobra o intervención. Aquí describimos las diferentes dietas que se utilizarán durante el estudio. Las dietas están compuestas en porcentaje por: caseína libre de vitaminas 20%(Harlan-Teklad), aceite de maíz al 5%, mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Teklad) 5%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan-Teklad) 1%, citrato de colina (Harlan-Teklad) 0.165% y dextrosa anhidra y almidón de maíz en una proporción 1:1 para completar el 100% de la dieta. Las dietas altas en grasa mantuvieron la misma composición que las anteriores excepto en el porcentaje de lípidos que en adición al 5% de aceite de maíz, contienen 20% de manteca de cerdo (alta en grasa saturada y colesterol). Las dietas balanceadas están basadas en las recomendaciones reportadas (Nutrition Research Council, 1995) sobre los requerimientos nutricionales de las ratas de laboratorio, incluyendo vitaminas y nutrimentos inorgánicos. Las dietas se administrarán de manera oral, ad libitum, empleando comederos individuales de acero inoxidable con tapadera con una capacidad de 200 gs. Con estas dietas se cubren los requerimientos de proteína y de grasa de las ratas en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, ya que el porcentaje de proteína que contienen es del 20% (los valores mostrados ya están ajustados de acuerdo a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína), mientras que el de grasa es del 5%. El alimento cumplirá con las siguientes características: estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. Estará dentro de su periodo de caducidad. Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: se utilizará agua potable, en bebederos individuales de cristal con capacidad de 500 ml para administrarse las 24 hs. La cantidad a mantener en cada bebedero sera de 250 ml diariamente.

f) Duración del seguimiento individual: El seguimiento será de 2 semanas de estudio.

8. Metodología: Criterios de selección

No Aplica.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Estos parametros fueron descritos en el Diseño general.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO :

NO APLICA

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : No aplica

11. Costos

| COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN | |
|------------------------------------|---------------|
| Admon. Gastos pacientes | \$ 0.00 |
| Animales | \$ 36,320.00 |
| Equipos | \$ 535,692.00 |
| Estudios | \$ 0.00 |
| Fondo de apoyo | \$ 0.00 |
| Materiales | \$ 610,920.00 |
| Personal | \$ 0.00 |
| Publicaciones | \$ 25,000.00 |
| Suscripciones | \$ 16,000.00 |
| Varios | \$ 10,000.00 |
| Viaticos | \$ 36,000.00 |

12. Citas bibliográficas.

1. Lowell, B.B. and B.M. Spiegelman, Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 2000. 404(6778): p. 652-60.
2. Visscher, T.L. and J.C. Seidell, The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health*, 2001. 22: p. 355-75.
3. Olaiz-Fernandez, G., Encuesta Nacional de Salud y Nutricion. 2006, Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Publica.
4. OMS. www.who.int/nut/obs.html.
5. Hill, J.O. and J.C. Peters, Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*, 1998. 280(5368): p. 1371-4.
6. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 2001. 414(6865): p. 799-806.
7. Meshkani, R. and K. Adeli, Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*, 2009. 42(13-14): p. 1331-46.
8. Jensen, M.D., et al., Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest*, 1989. 83(4): p. 1168-73.
9. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle. *J R Soc Med*, 2002. 95 Suppl 42: p. 8-13.
10. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 2006. 444(7121): p. 840-6.
11. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, Etiology of insulin resistance. *Am J Med*, 2006. 119(5 Suppl 1): p. S10-6.
12. Kakuma, T., et al., Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(15): p. 8536-41.
13. Dobrzyn, A. and J.M. Ntambi, The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. 73(1): p. 35-41.
14. Brosnan, J.T. and M.E. Brosnan, Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr*, 2006. 136(1 Suppl): p. 207S-11S.
15. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. Block, Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 1984. 4: p. 409-54.

16. Shimomura, Y., et al., Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2001. 4(5): p. 419-23.
17. Hutson, S.M., D. Fenstermacher, and C. Mahar, Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism. *J Biol Chem*, 1988. 263(8): p. 3618-25.
18. Suryawan, A., et al., A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr*, 1998. 68(1): p. 72-81.
19. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*. 2nd Edition ed. 1993: Worth Publishers.
20. Bieber, L.L. and Y.R. Choi, Isolation and identification of aliphatic shortchain acylcarnitines from beef heart: possible role for carnitine in branched-chain amino acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(7): p. 2795-8.
21. Buse, M.G. and S.S. Reid, Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest*, 1975. 56(5): p. 1250-61.
22. Fulks, R.M., J.B. Li, and A.L. Goldberg, Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem*, 1975. 250(1): p. 290-8.
23. Kimball, S.R. and L.S. Jefferson, Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr*, 2006. 136(1 Suppl): p. 227S-31S.
24. Layman, D.K. and D.A. Walker, Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*, 2006. 136(1 Suppl): p. 319S-23S.
25. Cota, D., et al., Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 2006. 312(5775): p. 927-30.
26. Lynch, C.J., et al., Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 291(3): p. E621-30.
27. Bianchi, G., et al., Update on nutritional supplementation with branched-chain amino acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005. 8(1): p. 83-7.
28. Donato, J., Jr., et al., Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition*, 2006. 22(5): p. 520-7.
29. Gordon-Elliott, J.S. and H.C. Margolese, Weight loss during prolonged branched-chain amino acid treatment for tardive dyskinesia in a patient with schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*, 2006. 40(2): p. 195.
30. Mourier, A., et al., Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers. *Int J Sports Med*, 1997. 18(1): p. 47-55.
31. Zhang, Y., et al., Increasing dietary leucine intake reduces diet induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes*, 2007. 56(6): p. 1647-54.
32. Felig, P., E. Marliss, and G.F. Cahill, Jr., Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *N Engl J Med*, 1969. 281(15): p. 811-6.
33. Rafecas, I., et al., Plasma amino acids of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet after weaning. *Biochem Int*, 1991. 25(5): p. 797-806.
34. Wijekoon, E.P., et al., Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004. 82(7): p. 506-14.
35. Khamzina, L., et al., Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*, 2005. 146(3): p. 1473-81.
36. Um, S.H., et al., Absence of S6K1 protects against age- and diet induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 2004. 431(7005): p. 200-5.
37. Um, S.H., D. D'Alessio, and G. Thomas, Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab*, 2006. 3(6): p. 393-402.
38. Newgard, C.B., et al., A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*, 2009. 9(4): p. 311-26.
39. Gregersen, N., Studies on the effects of saturated and unsaturated short-chain monocarboxylic acids on the energy metabolism of rat liver mitochondria. *Pediatr Res*, 1979. 13(11): p. 1227-30.
40. She, P., et al., Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab*, 2007. 6(3): p. 181-94.

- | |
|--|
| 41. Tischler, M.E., M. Desautels, and A.L. Goldberg, Does leucine, leucyltRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? <i>J Biol Chem</i> , 1982. 257(4): p. 1613-21. |
| 42. Miotto, G., R. Venerando, and N. Siliprandi, Inhibitory action of isovaleryl-L-carnitine on proteolysis in perfused rat liver. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , 1989. 158(3): p. 797-802. |
| 43. Sacci, J.B., Jr., Hepatocyte perfusion, isolation, and culture. <i>Methods Mol Med</i> , 2002. 72: p. 503-5. |
| 44. Torre-Villalvazo, I., et al., Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. <i>J Nutr</i> , 2008. 138(3): p. 462-8. |

CONVOCATORIA DE INVESTIGACION CIENTIFICA BASICA 2010

TITULO DEL PROYECTO:

Interacción entre la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos de cadena ramificada en la mitocondria y sus consecuencias durante la obesidad

SOLICITANTE:

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López

INSTITUCION:

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Fisiología de la Nutrición**

Antecedentes

1. Obesidad:

La obesidad es el resultado de un balance energético positivo donde la energía que se ingiere sobrepasa el gasto energético. Hoy en día, este desequilibrio energético es ampliamente favorecido por un suministro abundante de alimentos y un estilo de vida sedentario [1]. La obesidad representa un problema de salud pública ya que es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares [2]. En nuestro país el 70% de la población entre los 30 y 60 años cursa con sobrepeso y obesidad [3], causando más de 200,000 muertes anuales y un incremento significativo en los costos de la asistencia médica [4]. A pesar de múltiples investigaciones, la patogénesis de la obesidad humana no ha sido completamente esclarecida y su prevención y tratamiento son todavía complicados [5].

Durante la obesidad se presenta una alteración en los efectos biológicos de la insulina, hormona encargada de regular el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en el hígado, músculo y tejido adiposo [6]. Dicha alteración es conocida como resistencia a insulina. La resistencia a la insulina es una condición patológica que se origina por el acumulo de metabolitos de ácidos grasos como los diacilgliceroles y las ceramidas en músculo esquelético. Este incremento es el resultado de una oxidación ineficiente de los ácidos grasos en la mitocondria [7]. La resistencia a la insulina conduce a una elevada hidrólisis de los triglicéridos por el tejido adiposo que ocasiona un incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos [8]; en músculo, reduce la captura de glucosa [9]; y en hígado, causa una síntesis deficiente de glucógeno, una producción alterada de glucosa y un incremento en la síntesis de triglicéridos y proteínas [10]. En conjunto, estas alteraciones dan lugar a importantes anomalías como son la hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y esteatosis hepática [11].

La esteatosis hepática es el resultado del incremento en la síntesis de triglicéridos y de la disminución en la oxidación de los ácidos grasos en mitocondria. A nivel molecular, la acumulación de triglicéridos está mediada por un incremento en la expresión de los factores de transcripción lipogénicos como el SREBP1c y de las enzimas que median la formación de triglicéridos como son la sintasa de ácidos grasos (FAS), la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la estearil-CoA desaturasa (SCD1) y la Glicerol-fosfato acil transferasa (GPAT) [12]. Por el contrario, la disminución en la oxidación de ácidos grasos está asociada a una disminución la expresión del factor de transcripción

PPAR (Receptor activado por proliferados de peroxisomas)-alfa y de las enzimas carnitina-palmitoil transferasa (CPT1), la deshidrogenasa de grupos acil de cadena larga (LCAD) y la acetil-CoA oxidasa (ACO) [13]. De manera interesante, el análisis de la expresión de la CPT1 en el hígado de 41 cepas de ratones pertenecientes a la población de referencia genética BXD demostró una correlación inversa a la expresión de la enzima isovaleril CoA deshidrogenasa (IVDH) (Figura 1). La IVDH es una enzima mitocondrial involucrada en el catabolismo oxidativo de la leucina, un aminoácido de cadena ramificada. Dado que el grado de expresión de la CPT1 y de IVDH son indicativos del nivel de oxidación de sus respectivos substratos por la mitocondria, la correlación inversa entre estas dos enzimas sugiere que una mayor oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada disminuye la oxidación de los ácidos grasos. El presente trabajo pretende evaluar dicha interacción para lo que a continuación se brinda un panorama general del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

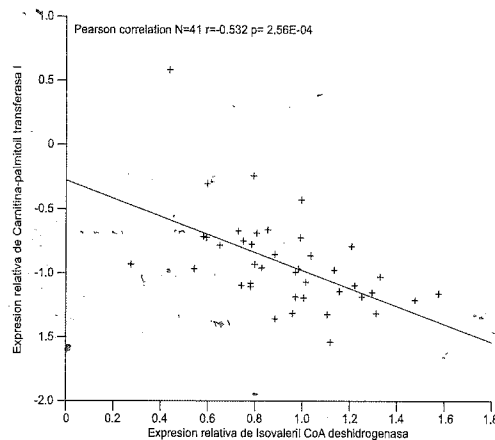


Figura 1. Correlación entre la expresión de la carnitina-palmitoil transferasa I y la Isovaleril CoA deshidrogenasa.

2. Amino ácidos de cadena ramificada:

Los aminoácidos de cadena ramificada, o BCAA por sus siglas en ingles, son la leucina, isoleucina y valina [14]. Estos aminoácidos conforman del 20 al 25% de la mayoría de las proteínas dietarias y se encuentran entre los nueve aminoácidos indispensables para los humanos [15]. Los BCAA son utilizados principalmente para la síntesis de proteínas y al no existir una reserva especial para ser almacenados, el exceso es metabolizado para ser eliminado [16]. El nitrógeno es eliminado vía transaminación, desaminación, y formación de urea; y los esqueletos de carbono se conservan generalmente como hidratos de carbono vía gluconeogénesis (AA glucogénicos), o como ácidos grasos vía síntesis del ácido graso (AA cetogénicos).

Los primeros pasos en el catabolismo de los BCAA son comunes para los tres aminoácidos e involucra a dos complejos enzimáticos: 1) la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) que da lugar a los α -cetoácidos de cadena ramificada [17]; y 2) la deshidrogenasa de los α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKD) que dan lugar a los ésteres de CoA de cadena ramificada [18]. El metabolismo posterior diverge existiendo una vía en particular para cada uno de los ésteres de CoA hasta que son incorporados al ciclo de Krebs o dan lugar a los cuerpos cetónicos [19]. Es importante mencionar que los ésteres de CoA de cadena ramificada pueden reaccionar con la L-carnitina produciendo acil-carnitinas de cadena ramificada de las cuales se desconoce si influyen en el metabolismo celular [20]. En la siguiente tabla se muestran los BCAA con el respectivo cetoácido y ester de CoA al que dan lugar.

| Aminoácido | α -Cetoácido | Ester de CoA | Categoría |
|------------|---------------------|------------------|-----------------------------|
| Leucina | Ceto-isocaproato | Isovaleril-CoA | Cetogénico |
| Isoleucina | Ceto-metilvalerato | Metilbutiril-CoA | Cetogénico y Glucogénico |
| Valina | Ceto-isovalerato | Isobutiril-CoA | Glucogénico |

A nivel molecular, los BCAA son capaces de regular varios procesos como la síntesis de proteínas, la secreción de insulina y la captura de aminoácidos por el cerebro. Por ejemplo, la leucina estimula la síntesis e inhibe la degradación de proteína en situaciones de abundancia de nutrientes [21, 22]. La estimulación de la síntesis de proteína por la leucina esta ligada a la activación de la vía de señalización del complejo blanco de la rampamicina de mamíferos 1 (mTORC1 por sus siglas en ingles) la cual involucra la fosforilación de S6K1, S6, 4EBP1, y eIF4B [23].

3. El papel de los BCAA durante la obesidad:

Actualmente existe una gran controversia con respecto al papel que los BCAA juegan en el desarrollo de la obesidad. La leucina es el BCAA que mas ha sido estudiado en este contexto [24]. Por ejemplo, la leucina se ha asociado con el control de la saciedad, el peso corporal y el gasto energético. La leucina estimula directamente la vía de señalización de mTOR en el hipotálamo dando lugar a una disminución en la ingesta de alimento [25]. También es capaz de influenciar la saciedad estimulando la secreción de leptina [26]. Por otro lado, suplementos dietarios de leucina han demostrado ser capaces de disminuir la masa grasa y el peso corporal y mejorar el metabolismo de la glucosa en algunos casos [24, 27-31]. Es muy importante tener en cuenta que en la mayoría de estos estudios el

efecto de la leucina se determino en un contexto de estrés energético originado ya sea por restricción calórica o ante la realización habitual de ejercicio, que generalmente no es el caso en pacientes obesos.

Paradójicamente, otros estudios no apoyan la teoría del papel anti-obesidad de los BCAA. Por ejemplo, existe evidencia de que las concentraciones de BCAA se encuentran elevadas en humanos obesos y en modelos animales de obesidad [32-34]. También se ha demostrado que durante una sobrealimentación, incluyendo un exceso en el consumo de leucina, la hiperactivación de la señalización de TORC1, es capaz de agravar la resistencia a la insulina disminuyendo la fosforilación de AKT y aumentando la fosforilación de la serina 307 del sustrato del receptor de insulina1 (IRS1) inactivando su señalización posterior [35-37].

Un estudio reciente en el que se comparo una amplia gama de metabolitos cuantificados en el plasma de sujetos delgados y obesos, mostró que además del incremento en las concentraciones de los BCAA, el perfil de los sujetos obesos esta caracterizado por un incremento significativo en las concentraciones de las acil-carnitinas derivadas de los BCAA [38]. Interesantemente, el incremento en las acil-carnitinas mostró un correlación directamente proporcional con el grado de resistencia a la insulina en los sujetos obesos (Figura 2).

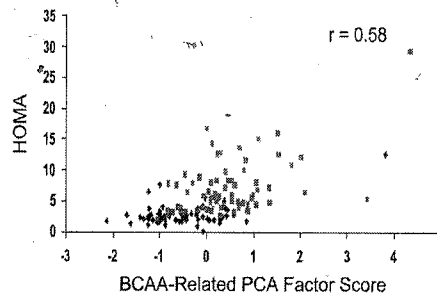


Figura 2. Correlación entre la resistencia a la insulina evaluada por el HOMA y el factor relacionado con los aminoácidos de cadena ramificada.

Estudios en animales realizados en base ha estos hallazgos demostraron que suplementar una dieta alta en grasa con BCAA en efecto disminuye el consumo de energía y el peso corporal, pero no ocasiona ninguna diferencia en el grado de resistencia a la insulina. Asimismo, los animales que recibieron la dieta alta en grasa suplementada con BCAA presentaron los niveles mas altos de las acil-carnitinas [38]. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que las acil-carnitinas de los BCAA son capaces de competir con los ácidos grasos y el piruvato para su oxidación [39], probablemente estimulando la lipogénesis. En conjunto estos resultados sugieren que en situaciones

de sobrealimentación, el aumento de los BCAA circulantes son desviados hacia vías catabólicas y que los metabolitos intermediarios de este catabolismo pudieran estar involucrados con la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos incrementando su acumulación en tejidos como hígado y músculo esquelético, lo cual contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática.

En apoyo a esta teoría, She y colaboradores demostraron como ratones con una deficiencia de la BCAT presentaban concentraciones considerablemente elevadas de los BCAA lo cual se asocio con un incremento en el consumo de alimento. De manera interesante, estos animales eran resistentes al desarrollo de obesidad inducida por dieta y no presentaban resistencia a la insulina ni intolerancia a la glucosa [40]. La deficiencia de la BCAT en estos animales, bloqueo por completo el catabolismo de los BCAA impidiendo la producción de metabolitos intermediarios como las acil-carnitinas. Se ha demostrado *in vitro* que el catabolismo de la leucina es necesario para inhibir la proteólisis [41] y en particular que la isovaleril-carnitina derivada del catabolismo de la leucina es capaz de inhibir eficientemente este proceso [42]. Una proteólisis perpetua en los animales deficientes de BCAT contribuye a un ciclo proteico donde solo se sintetiza proteína, proceso que consume grandes cantidades de energía. De este modo, el incremento en el consumo de energía y la resistencia al desarrollo de la obesidad inducida por dieta de los animales deficientes de BCAT es probablemente debido a altos niveles de oxidación de glucosa y ácidos grasos para cubrir los requerimientos de ATP para mantener este ciclo fútil de síntesis y degradación de proteínas.

Hipótesis

Las acil-carnitinas derivadas de los aminoácidos de cadena ramificada son capaces de alterar *in vivo* el ciclo proteico inhibiendo la degradación de proteínas. Asimismo, son capaces de inhibir la oxidación de los ácidos grasos estimulando la síntesis de triglicéridos. Estos cambios metabólicos contribuyen de manera importante al desarrollo de resistencia a la insulina mediada por lípidos durante la obesidad. Si esto es cierto, el diseño de Estrategias farmacológicas que incrementen la degradación de las acil-carnitinas o eviten su producción representarían una importante alternativa en el tratamiento de la obesidad.

Objetivos general y particulares

1. Objetivo general:

Determinar el efecto de la isovaleril-carnitina (carnitina derivada del catabolismo de la leucina) sobre el metabolismo de lípidos y la síntesis/degradación de proteínas en hígado y músculo esquelético de ratones con obesidad inducida por dieta, en ratones deficientes de BCAT y en cultivo primario de hepatocitos.

2. Objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto *in vivo* de la suplementación en la dieta con isovaleril-carnitina en ratones con obesidad inducida por dieta sobre:
 - a. El consumo de alimento y la ganancia de peso.
 - b. El gasto energético medido por calorimetría indirecta y la tolerancia a la glucosa.
 - c. El perfil bioquímico y hormonal.
 - d. El contenido de lípidos en hígado.
 - e. La expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y en la síntesis de triglicéridos.
 - f. El contenido y estado de fosforilación de proteínas involucradas en la síntesis/ degradación de proteínas y en la cascada de señalización de la insulina.
 - g. La tasa de síntesis y degradación de proteínas usando marcadores titriados.
2. Evaluar el efecto de la isovaleril-carnitina dietaria sobre la resistencia a la insulina en ratones con obesidad inducida por dieta mediante:
 - a. Clamp euglicémico-hiperinsulinémico.
 - b. Análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina en hígado y músculo esquelético.
3. Evaluar si la isovaleril-carnitina dietaria es capaz de inducir obesidad en ratones deficientes de BCAT alimentados con dieta alta en grasa.
4. Evaluar el efecto *in vitro* de la isovaleril-carnitina en cultivos primarios de hepatocitos sobre:
 - a. La oxidación de ácidos grasos mediante el análisis de la expresión de PPAR alfa, CPT1, LCAD y ACO y la oxidación de palmitato [C14].
 - b. La síntesis de triglicéridos mediante el análisis de la expresión de SREBP1c, ACC, FAS, SCD1 y GPAT y la

- evaluación del contenido de triglicéridos.
- c. La fosforilación de las proteínas mTOR, S6K1 y eIF2, mediadores de la síntesis de proteína.

Metas: Científicas y de formación de maestros y doctores

1. Al final del proyecto conoceremos si la isovaleril-carnitina es capaz de modificar el metabolismo de lípidos y la síntesis/degradación de proteínas durante la obesidad, con el fin de establecer a las acil-carnitinas, como un importante blanco farmacológico en el tratamiento de la obesidad.
2. La realización de este proyecto permitirá la formación de un maestro y un doctor en ciencias.
3. Los resultados obtenidos de este proyecto se presentaran en dos congresos internacionales y se publicaran en dos artículos en revistas internacionales indexadas con un factor de impacto de 3 o 4.

Metodología científica

1. Para evaluar el efecto *in vivo* de la isovaleril-carnitina se seguirá el siguiente protocolo:

a. Modelo animal:

Se utilizarán 120 ratones C57B6 macho de 20-40 gramos, los cuales serán obtenidos de Harlan de México. Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ). El protocolo del presente estudio esta en proceso de evaluación por el comité de ética para el uso de animales de experimentación del INCMNSZ. Los animales se mantendrán en microaisladores con una densidad de 4 ratones por caja con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta y al agua. Se realizará un estudio preliminar con 20 ratones para determinar la vía de administración y la dosis adecuada de isovaleril-carnitina para obtener los valores observados en pacientes obesos. La concentración plasmática de isovaleril-carnitina se determinara en colaboración y como fue descrito por Newgard y col. [38]. Una vez establecidas la dosis y la vía de administración, los ratones restantes se dividirán en 4 grupos experimentales de 25 ratones cada uno. Al grupo 1 se les suministrará una dieta control con 5% de lípidos y vehiculo, el grupo 2 recibirá una dieta control e isovaleril-carnitina, el grupo 3 tendrá una dieta alta en grasa con 60% de calorías provenientes de lípidos y vehiculo, y finalmente el grupo 4 recibirá dieta alta en grasa e isovaleril-carnitina. Las dietas serán obtenidas de Harlan-Teklad.

b. Evaluación del fenotipo metabólico:

El estudio tendrá una duración de 10 semanas, tiempo necesario para que los ratones desarrollen la obesidad inducida por dieta. Durante este periodo se registrará dos veces por semana la ganancia de peso y el consumo de alimento. Posteriormente se realizarán las siguientes pruebas fisiológicas:

i. Evaluación del gasto energético:

El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta (Oxymax, Columbus Instruments, equipo de reciente adquisición en el departamento). Los animales serán colocados en una cámara con un flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO₂ serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de oxígeno y el coeficiente de respiración (RQ).

ii. Valoración de la tolerancia a la glucosa:

Se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa en 10 ratones de cada grupo. Los animales serán inyectados vía IP con una solución de glucosa al 20% a una concentración de 2.0 mg/g del peso corporal y la glucosa sanguínea será evaluada a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Se colectará aproximadamente 200µl de sangre en cada punto para determinar la concentración de insulina plasmática.

c. Obtención de muestras y tejidos:

Una vez realizadas las pruebas fisiológicas, los animales serán sometidos a un ayuno de 12 horas para la obtención de sangre a través de la vena porta, y la obtención de hígado y músculo esquelético. Muestras de estos tejidos se colocarán en criotubos, se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C. En las muestras obtenidas se realizarán los estudios siguientes:

i. Perfil bioquímico y hormonal:

Se evaluará la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, albúmina, urea y creatinina en suero utilizando ensayos enzimáticos-colorimétrico (Cobas C111, Roche). La concentración de insulina, glucagón, leptina, y adiponectina será determinada por radioinmunoensayo (Linco).

ii. Contenido lipídico en hígado:

Se extraerán los lípidos totales de acuerdo al método de Folch, el cual se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogenizado en una solución solvente que al añadir agua y centrifugar forma dos fases. En la fase acuosa se encuentran los compuestos hidrofílicos y en la superior se encuentra la fase orgánica que contiene los lípidos. Se evapora para concentrar el contenido de lípidos en el fondo del tubo. La pastilla lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10%. Finalmente, se determina la concentración de triglicéridos en el extracto por los métodos anteriormente mencionados.

iii. *Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de triglicéridos y en la oxidación de ácidos grasos:*

Se obtendrá el mRNA total de muestras de hígado y músculo esquelético con TRIzol, utilizando el método descrito por el proveedor. Este método consiste en una digestión con TRIzol, seguida de una extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol. La expresión de SREBP1c, ACC, FAS, SCD1, GPAT PPAR α , CPT1, LCAD, y ACO se cuantificará por PCR en tiempo real usando ensayos fluorogénicos TaqMan de Applied Biosystems (AB), en un equipo ABI prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (AB, User Bulletin no.2). La reacción se llevará a cabo usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR Master Mix, AB), preparando reacciones sin RNA paralelamente a las muestras como-control. Las muestras se correrán por triplicado. Los valores obtenidos se normalizarán dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural (18S) en cada reacción.

iv. *Análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas y en la cascada de señalización de la insulina.*

Se obtendrán proteínas totales de muestras de hígado y músculo y se analizará la cantidad de mTOR, S6K1, eIF2, AKT e IRS1 fosforilada por medio de western-blot como se ha descrito [44]. Brevemente, se determinará la concentración de proteínas en el extracto total por medio del estuche para análisis de proteínas DC (Bio-Rad). Cantidades equivalentes de cada muestra serán cargadas para electroforesis en SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF (Amersham). Las membranas se bloquean incubándolas en leche descremada al 0.4% e incubación por 12h con el anticuerpo primario a 4°C. se utilizará β -actina como control de carga. Finalmente las membranas se incubarán con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 45 min y las bandas se visualizarán con un reactivo quimioluminiscente (Visualizer Spray and Glow, Santa Cruz).

d. Tasa de síntesis y degradación de proteínas:

Para determinar el efecto de la isovaleril-carnitina sobre el ciclo proteico se analizará la tasa de síntesis de proteína evaluando la incorporación de ^3H -fenilalanina a proteína como se describió anteriormente [40]. Para esto 10 animales de los cuatro grupo serán inyectados con ^3H -fenilalanina y 15 minutos después se colectará la sangre y muestras de los órganos. Para evaluar la tasa de degradación de proteína se determinará la creatinina urinaria y la 3-metilhistidina, ambos indicativos de la degradación de proteínas miofibrilares.

2. Para evaluar si las acil-carnitinas son capaces de inducir obesidad en ratones deficientes de BCAT alimentados con una dieta alta en grasa se seguirá el siguiente protocolo:

- a. Modelo animal:

Se utilizarán 90 ratones macho de aproximadamente 20g, de los cuales 45 serán deficientes para la BCAT y 45 serán controles. Los animales serán obtenidos a través de una colaboración con el Dr. Christopher J. Lynch de la Universidad de Pensilvania (Pennsylvania, USA). Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. El protocolo del presente estudio está en proceso de evaluación por el comité de ética para el uso de animales de experimentación del INCMNSZ. Los animales se mantendrán como se mencionó anteriormente y serán divididos en tres grupos experimentales: el Grupo 1 que recibirá la dieta control y vehículo, el Grupo 2 que recibirá una dieta con 60% de contenido en lípidos y vehículo, y el grupo 3 que recibirá una dieta alta en grasa e isovaleril-carnitina. Cada uno de los grupos estará conformado por 15 ratones controles y 15 ratones deficientes de BCAT.

- b. Evaluación del fenotipo metabólico:

El estudio tendrá una duración de 10 semanas. Durante este periodo se registrará dos veces por semana la ganancia de peso y el consumo de alimento. Posteriormente se realizarán las pruebas fisiológicas que se mencionaron anteriormente.

3. Para evaluar si la isovaleril-carnitina tiene un efecto directo sobre la resistencia a la insulina se realizará un clamp euglicémico-hiperinsulinémico en ratones alimentados con una dieta suplementada con isovaleril-carnitina siguiendo el siguiente protocolo:

Se utilizarán 20 ratones C57B6 de aproximadamente 30g los cuales se dividirán en dos grupos. Los animales se anestésian con Ketamina y Xilacina y se someterán a una cirugía donde se canulará la vena yugular y la arteria carótida. Inicialmente, se rasura el área central del cuello del animal y se realiza una pequeña incisión en este lugar y dos cánulas se llenan con solución de heparina. Una vez heparinizadas, se disecciona la vena yugular colocando en cada uno de los extremos hilo quirúrgico para bloquear el flujo sanguíneo, posteriormente, se realizó una pequeña incisión y con ayuda de unas pinzas de punta fina se introduce la cánula respectiva. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con la arteria carótida. Una vez dentro del vaso, la cánula se fija realizando un nudo con cada uno de los hilos quirúrgicos. Para terminar, se procede a suturar la incisión fijando perfectamente con hilo quirúrgico los extremos de cada una de las cánulas y los animales se dejaron recuperar de la cirugía por 4 días.

Posteriormente, la cánula colocada en la yugular se conectara a una vía de dos pasos. Uno de los pasos estará conectado a una tubería proveniente de una bomba de infusión que administrara de manera constante una solución de insulina a una velocidad de 100mU/Kg/min en conjunto con una solución vehículo (Grupo 1) o una solución con isovaleril-carnitina. La solución de insulina mantendrá los niveles de insulina plasmáticos a aproximadamente 40mU/L por 2 horas. La elevación de la concentración de insulina genera un decremento en los niveles de glucosa sérica, la disminución en la concentración de glucosa puede ser modificada por la infusión de la isovaleril-carnitina. Los niveles de glucosa se mantendrán en 100 mg/dl (euglicemia) administrando de manera variable una solución de glucosa al 20% por el otro paso de la vía colocada en la cánula. Para mantener la euglicemia, se obtendrán muestras sanguíneas cada 5 min en las que se le determinara inmediatamente la concentración de glucosa para que con este dato se pudiera modificar el rango de infusión de la glucosa. El rango de infusión de glucosa durante la última hora del clamp se tomó como un parámetro de respuesta que indica la sensibilidad a la insulina. Al termino del experimento se tomaran muestras de tejidos como se menciona anteriormente para evaluar la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de insulina.

4. Para evaluar el efecto *in vitro* de isovaleril-carnitina en el metabolismo lipídico y en la síntesis/degradación de proteínas se seguirá el siguiente protocolo:

a. Cultivo primario de hepatocitos:

Se obtendrán hepatocitos de ratas Sprague-Dawley macho provenientes del bioterio del INCMNSZ de 6 semanas como lo describe Sacci [43]. Las células se cultivarán en pozos de 3 cm² a una densidad de 6000 células/cm² en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico (Roche). Los hepatocitos primarios serán incubados con las concentraciones de isovaleril-carnitina encontradas en sujetos delgados y obesos [38]. Se realizara una curva tiempo-respuesta para evaluar el efecto de la isovaleril-carnitina en los diferentes parámetros que se describen a continuación:

i. Análisis de la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos:

Después de transcurrido el tiempo respectivo de incubación, se obtendrá el RNA de los hepatocitos. El análisis del contenido de mRNA de PPAR alfa, CPT1, LCAD, y ACO se realizará como se describió anteriormente.

ii. Oxidación de palmitato:

Para evaluar el efecto de la isovaleril-carnitina sobre la oxidación de los ácidos grasos, los hepatocitos tratados con isovaleril-

carnitina serán incubados por 1 hora con palmitato marcado con ^{14}C . La tasa de oxidación de palmitato se determinará cuantificando la producción de $^{14}\text{CO}_2$. Para cuantificar el $^{14}\text{CO}_2$, se empleará un tubo en T unido a viales de líquido de centelleo que contendrá una mezcla de etanolamina:metilcelosolve que funciona como trampa de CO_2 . Los tubos serán cuantificados utilizando un contador de partículas beta.

iii. *Análisis de la expresión de genes involucrados en la síntesis de triglicéridos:*

El contenido de SREBP1c, ACC, FAS, SCD1 y GPAT será evaluado como se describió anteriormente.

iv. *Análisis del contenido de triglicéridos en los hepatocitos primarios:*

Se utilizará la tinción rojo oleoso para evaluar el contenido de triglicéridos en hepatocitos tratados con isovaleril-carnitina. Los hepatocitos se fijarán con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min. y se teñirán con la solución de rojo oleoso por 2 h a temperatura ambiente. Se tomarán fotografías de las células bajo el microscopio. Para un análisis cuantitativo del contenido celular de triglicéridos, las células se lavarán con PBS y se recolectarán por raspado utilizando 50mM Tris-HCl (pH 7.5) con 1mM EDTA. Las células serán sonicadas por 5s a 40W y centrifugadas a 13,000g por 5 min. a 48°C. Los sobrenadantes serán utilizados para cuantificar los triglicéridos por medio de un ensayo enzimático-colorimétrico (DiaSys Diagnostic Systems GMBH, Holzheim, Alemania).

v. *Análisis de la fosforilación de proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de proteínas:*

Se determinará la cantidad de mTOR, S6K1 y eIF2 fosforilada por medio de western-blot en extractos totales de los hepatocitos tratados con isovaleril-carnitina como se describió anteriormente.

5. Análisis estadístico:

Los resultados se presentarán como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Los datos con una distribución variable se transformarán logarítmicamente antes de su análisis. Los datos serán evaluados usando un análisis de varianza de una vía y cuando la interacción resulte significativa se realizará la prueba PLSD de Fisher. Las diferencias se considerarán significativas con una $p < 0.05$. Todos los análisis se realizarán en el programa StatView 4.5 (Abacus Concepts) para Macintosh.

Bibliografía

1. Lowell, B.B. and B.M. Spiegelman, *Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 652-60.
2. Visscher, T.L. and J.C. Seidell, *The public health impact of obesity*. Annu Rev Public Health, 2001. **22**: p. 355-75.
3. Olaiz-Fernandez, G., *Encuesta Nacional de Salud y Nutricion*. 2006, Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Publica.
4. OMS. www.who.int/nut/obs.html.
5. Hill, J.O. and J.C. Peters, *Environmental contributions to the obesity epidemic*. Science, 1998. **280**(5368): p. 1371-4.
6. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
7. Meshkani, R. and K. Adeli, *Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. Clin Biochem, 2009. **42**(13-14): p. 1331-46.
8. Jensen, M.D., et al., *Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity*. J Clin Invest, 1989. **83**(4): p. 1168-73.
9. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, *Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle*. J R Soc Med, 2002. **95 Suppl 42**: p. 8-13.
10. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
11. Petersen, K.F. and G.I. Shulman, *Etiology of insulin resistance*. Am J Med, 2006. **119**(5 Suppl 1): p. S10-6.
12. Kakuma, T., et al., *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8536-41.
13. Dobryzyn, A. and J.M. Ntambi, *The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 35-41.
14. Brosnan, J.T. and M.E. Brosnan, *Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation*. J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 207S-11S.
15. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. Block, *Branched-chain amino acid metabolism*. Annu Rev Nutr, 1984. **4**: p. 409-54.
16. Shimomura, Y., et al., *Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2001. **4**(5): p. 419-23.
17. Hutson, S.M., D. Fenstermacher, and C. Mahar, *Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism*. J Biol Chem, 1988. **263**(8): p. 3618-25.
18. Suryawan, A., et al., *A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(1): p. 72-81.
19. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*. 2nd Edition ed. 1993: Worth Publishers.
20. Bieber, L.L. and Y.R. Choi, *Isolation and identification of aliphatic short-chain acylcarnitines from beef heart: possible role for carnitine in branched-chain amino acid metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 2795-8.

21. Buse, M.G. and S.S. Reid, *Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle.* J Clin Invest, 1975. **56**(5): p. 1250-61.
22. Fulks, R.M., J.B. Li, and A.L. Goldberg, *Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm.* J Biol Chem, 1975. **250**(1): p. 290-8.
23. Kimball, S.R. and L.S. Jefferson, *Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis.* J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 227S-31S.
24. Layman, D.K., and D.A. Walker, *Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome.* J Nutr, 2006. **136**(1 Suppl): p. 319S-23S.
25. Cota, D., et al., *Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.* Science, 2006. **312**(5775): p. 927-30.
26. Lynch, C.J., et al., *Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(3): p. E621-30.
27. Bianchi, G., et al., *Update on nutritional supplementation with branched-chain amino acids.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(1): p. 83-7.
28. Donato, J., Jr., et al., *Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction.* Nutrition, 2006. **22**(5): p. 520-7.
29. Gordon-Elliott, J.S. and H.C. Margolese, *Weight loss during prolonged branched-chain amino acid treatment for tardive dyskinesia in a patient with schizophrenia.* Aust N Z J Psychiatry, 2006. **40**(2): p. 195.
30. Mourier, A., et al., *Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers.* Int J Sports Med, 1997. **18**(1): p. 47-55.
31. Zhang, Y., et al., *Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multiple mechanisms.* Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1647-54.
32. Felig, P., E. Marliss, and G.F. Cahill, Jr., *Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity.* N Engl J Med, 1969. **281**(15): p. 811-6.
33. Rafecas, I., et al., *Plasma amino acids of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet after weaning.* Biochem Int, 1991. **25**(5): p. 797-806.
34. Wijekoon, E.P., et al., *Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes.* Can J Physiol Pharmacol, 2004. **82**(7): p. 506-14.
35. Khamzina, L., et al., *Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance.* Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1473-81.
36. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity.* Nature, 2004. **431**(7005): p. 200-5.
37. Um, S.H., D. D'Alessio, and G. Thomas, *Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1.* Cell Metab, 2006. **3**(6): p. 393-402.

38. Newgard, C.B., et al., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **9**(4): p. 311-26.
39. Gregersen, N., *Studies on the effects of saturated and unsaturated short-chain monocarboxylic acids on the energy metabolism of rat liver mitochondria*. *Pediatr Res*, 1979. **13**(11): p. 1227-30.
40. She, P., et al., *Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle*. *Cell Metab*, 2007. **6**(3): p. 181-94.
41. Tischler, M.E., M. Desautels, and A.L. Goldberg, *Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle?* *J Biol Chem*, 1982. **257**(4): p. 1613-21.
42. Miotto, G., R. Venerando, and N. Siliprandi, *Inhibitory action of isovaleryl-L-carnitine on proteolysis in perfused rat liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **158**(3): p. 797-802.
43. Sacci, J.B., Jr., *Hepatocyte perfusion, isolation, and culture*. *Methods Mol Med*, 2002. **72**: p. 503-5.
44. Torre-Villalvazo, J., et al., *Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet*. *J Nutr*, 2008. **138**(3): p. 462-8.

Grupo de trabajo: Institución(es) participante(s) e integrantes

1. Dra. Nimbe Torres y Torres SNI 3
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Depto. Fisiología de la Nutrición.
2. QFB. Guillermo Ordaz Nava
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Depto. Fisiología de la Nutrición.
3. Estudiante de Doctorado del Programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Infraestructura disponible en las instituciones participantes

El Dpto. de Fisiología de la Nutrición consta de 4 laboratorios:

1. El laboratorio 1 consta de 2 áreas, el área 1 tiene un espectrofotómetro, 1 refrigerador a -4°C , 1 congelador a -20°C , 1 agitador orbital, 1 secuenciador capilar, 1 campana de extracción, 1 secador de geles; 1 secuenciador capilar. El área 2 tiene 2 fuentes de poder y diferentes tipos de cámaras de electroforésis, 1 equipo para fotografía de geles, 1 computadora, 1 horno de UV, 1 speed vac, 1 microcentrífuga, 1 microcentrífuga refrigerada y el área de lavado de material.
2. El laboratorio 2 consta de 2 ultracongeladores, 1 congelador a -20°C , 1 polytrón, 1 ultracentrífuga, 1 centrífuga refrigerada, 2 termobloques, 1 termociclador, 1 termociclador de gradiente, 1 termociclador de tiempo real, 1 ultracentrífuga, 1 cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama y un automuestriador, un área para estudiantes de licenciatura o de posgrado con 2 computadoras e internet.
3. El laboratorio 3 consta de un área para cultivo con 2 campanas de flujo laminar, 1 refrigerador, 1 microscopio estereoscópico, 2 estufas de cultivo a 37°C , 1 microcentrífuga. Tiene un área de contadores uno para partículas beta y otro para partículas gamma, 2 baños con agitación, 1 sistema de perfusión. Cuenta también con un área de radiactividad con dos contadores uno para partículas beta y otro para partículas gamma y un equipo de autoradiografía electrónica instant imagen, 1 centrífuga de bajas revoluciones.
4. El laboratorio 4 consta de 1 HPLC, un refrigerador y contará con un calorímetro.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- D) SE TESTA FOTO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**