



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**“Efecto de la obesidad inducida por una dieta alta en  
grasa sobre el grado de fosforilación de la proteína  
tau en ratones C57BL/6 adultos-jóvenes”**

Memoria para optar al título profesional de  
Bioquímico(a)

**Constanza Valentina Riquelme Sanhueza**

**Director**

**María Elsa Pando San Martín**

Departamento de Nutrición

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

**Patrocinante**

**Lorena García Nannig**

Dpto Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

**Septiembre, 2023**

## **FINANCIAMIENTO**

---

Esta memoria se realizó en el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. María Elsa Pando San Martín.

El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto de investigación en salud Facultad de Medicina de la Universidad de Chile 2018, titulado “EFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE NEURODEGENERACIÓN EN RATONES C57BL/6J”.

## PRODUCTIVIDAD

---

**2023.** III CONGRESO INTERNACIONAL Y VIII ENCUENTROS HISPANO-CUBANOS EN CIENCIAS DE LA SALUD. GRANADA, ESPAÑA. Pando, M.; **Riquelme, C.**; Hernández, C. *Efecto de una dieta alta en grasa en la fosforilación de marcadores de neurodegeneración temprana.* (Formato póster).

**2022.** PARTICIPACIÓN EN III NOCHE IBEROAMERICANA DE LOS INVESTIGADORES. Organizado por la Organización de Estados Iberoamericanos (OEI). *Participación en vídeo de divulgación científica de la red REVALIF.*

A Eva, Erasmo y Jorge.

Siempre presentes en nuestros corazones.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A mi familia por su apoyo y confianza incondicional.

A mi directora, Dra. María Elsa Pando, por confiar, aceptarme, guiarme y aguantarme como tesista. Le agradezco infinitamente por las oportunidades y apoyo que me brindó, especialmente las semanas previas a entregar el presente escrito.

A mi patrocinante, Dra. Lorena García, por amablemente gestionar cada problema que surgió y orientarme durante todo el proceso.

A Dr. Alfonso Paredes por sus útiles consejos y sugerencias de mejoras para este escrito.

A mi querida gente del tercer piso: Álvaro, Juani, Jorge y Karla por sus valiosos consejos sobre el manejo de tejidos, las cuantificaciones de proteínas y Western blot; Ely, Silvia y mis compañeras tesistas por todo su cariño y charlas.

A Dr. Mario Chiong y el ACCDIS por gentilmente permitirme usar vuestro equipo de revelado.

A Dra. Gladys Tapia por facilitarme reactivos, espacio de trabajo e invaluable consejos siempre que lo necesité. Le guardo un cariño infinito.

A Apu, Leslye y Pinkus, por su infinita disponibilidad y generosidad con que atendieron mis consultas, me aconsejaron y facilitaron reactivos.

A Juan Carlos y el laboratorio de “Química de los alimentos” por todo el cariño y buena onda.

A mis profesores y profesoras del Colegio Louis Pasteur, Bachillerato y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por la formación de recibida.

A Bienestar Estudiantil y Sandra Liberona, nuestra querida psicóloga de la Facultad, por la gran labor que realizan y estar siempre presentes desde que entré a la carrera.

A Secretaria de Estudios y Dirección de Pregrado por su infinita ayuda y amabilidad.

Mi sincera, absoluta y eterna gratitud para con cada uno de ustedes.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Obesidad.....	11
1.2 Tauopatías y enfermedad de Alzheimer.....	12
1.3 Tau, fosforilaciones y citoesqueleto.....	13
1.4 Obesidad y neurodegeneración.....	16
1.5 Dietas altas en grasa y neurodegeneración.....	17
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1 Materiales.....	22
4.2 Métodos	
4.2.1 Animales.....	23
4.2.2 Tratamiento dietario de los animales.....	23
4.2.3 Procedimiento previo de preparación de las muestras.....	26
4.2.4 Preparación de las muestras.....	26
4.2.5 Cuantificación de proteínas.....	26
4.2.6 Determinación de los niveles de fosforilación de GSK-3 $\beta$ y Tau.....	27
4.2.7 Análisis estadísticos.....	29

<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 Cambios en los niveles de fosforilación de GSK-3 $\beta$ .....	30
5.2 Cambios en los niveles de fosforilación de tau.....	32
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>
ANEXO 1.....	49
ANEXO 2.....	50
ANEXO 3.....	51
ANEXO 4.....	52
ANEXO 5.....	53
ANEXO 6.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Regulación de la fosforilación de tau.	14
<b>Figura 2</b> Regulación de la actividad de GSK-3 $\beta$ .	15
<b>Figura 3</b> Representación esquemática del diseño experimental utilizado.	25
<b>Figura 4</b> Cerebros de ratón C57BL/6J.	26
<b>Figura 5</b> Membrana teñida con rojo Ponceau posterior a la electrotransferencia.	28
<b>Figura 6</b> Detección de GSK-3 $\beta$ fosforilada en serina 9 mediante WB en triplicado.	30
<b>Figura 7</b> Cambios en GSK-3 $\beta$ , asociados a una dieta alta en grasas.	31
<b>Figura 8</b> Detección de tau fosforilada en treonina 205 mediante WB en triplicado.	32
<b>Figura 9</b> Cambios en tau asociados a una dieta alta en grasas.	33



## ÍNDICE DE TABLAS

---

		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Composición nutricional y aporte calórico de la dieta control.	24
<b>Tabla 2</b>	Composición nutricional y aporte calórico de la dieta alta en grasa.	25
<b>Tabla 3</b>	Soluciones para preparar dos geles de Tris-glicina para electroforesis SDS-PAGE.	27

## **ABREVIATURAS**

---

**AA:** Ácido araquidónico

**AB:** Anticuerpo

**ABC:** Área bajo la curva

**AG:** Ácidos grasos

**AGL:** Ácidos grasos libres

**AGPI:** Ácidos grasos poliinsaturados

**AGS:** Ácidos grasos saturados.

**Akt:** Serina/treonina quinasa

**AMPK:** Quinasa activada por monofosfato de adenina

**BCA:** Ácido bicinconínico

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CARTPT:** Prepropéptido CART

**Cdk5:** Quinasa dependiente de ciclina 5

**DAG:** Dieta alta en grasas

**DC:** Dieta control

**DMT2:** Diabetes Mellitus tipo 2

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**ECNT:** Enfermedades crónicas no transmisibles

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GS:** Grasas saturadas

**GSK-3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$

**CLS:** Estructuras en forma de corona

**HOMA-%B:** HOMA-%  $\beta$ -células

**HOMA-IR:** Índice de resistencia a la insulina HOMA

**HOMA-%S:** Porcentaje de sensibilidad HOMA

**HRP:** Peroxidasa de rábano picante

**IGF-1R:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IL-6:** Interleucina 6

**IMC:** Índice de masa corporal

**IR:** Receptor de insulina

**IRS-1:** Sustrato del receptor de insulina 1

**IP:** Intraperitoneal

**JNK:** Quinasa c-Jun N-terminal

**kDa:** Kilo Dalton

**MAPK:** MAP quinasa

**MAPs:** Proteínas asociadas a los microtúbulos

**MAPT:** Proteína tau asociada a microtúbulos

**MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos 1

**NFTs:** Depósitos fibrilares de tau hiperfosforilada

**OCDE:** Organización para la cooperación y el desarrollo económico

**OR:** Razón de probabilidad

**OXPHOS:** Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial

**PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno 1

**PBS:** Tampón salino de fosfato

**PHF:** Filamentos helicoidales emparejados

**PI3K:** Fosfoinositol 3 quinasa

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKB:** Proteína quinasa B

**PP1A:** Proteína fosfatasa 1A

**PP2A:** Proteína fosfatasa 2A

**QUICKI:** Índice de verificación de sensibilidad a la insulina cuantitativo más bajo

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**RI:** Resistencia a la insulina

**RIPA:** Tampón de ensayo de radioinmuno precipitación

**RTK:** Receptores de tirosina quinasa

**SAPK:** Proteínas quinasas activadas por estrés

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SER:** Serina

**SEM:** Error estándar de la media

**SNC:** Sistema nervioso central

**TBS-T:** Tampón salino de tris con tween 20

**TEMED:** N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina

**THR:** Treonina

**TLR-4:** Receptor tipo toll 4

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TYR:** Tirosina

**UA:** Unidades arbitrarias

**WB:** Western blot

**WT:** Fenotipo salvaje

## **RESUMEN: "EFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASA SOBRE EL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU EN RATONES C57BL/6 ADULTOS-JÓVENES"**

---

**Antecedentes:** La obesidad es un problema de salud pública mundial cada vez más alarmante, debido a sus comorbilidades, que incluyen un mayor riesgo de desarrollar trastornos neurodegenerativos como las tauopatías. Estudios sugieren que la obesidad asociada al consumo de dietas ricas en grasas puede promover la hiperfosforilación de tau en adultos, ya que, los productos de peroxidación lipídica pueden activar GSK-3 $\beta$  y promover la fosforilación de tau y la neurodegeneración temprana. Sin embargo, los mecanismos de cómo los nutrientes y la obesidad pueden afectar el riesgo de desarrollar demencia aún no están claros.

**Hipótesis:** La obesidad inducida por una dieta alta en grasas produce la activación temprana de vías neurodegenerativas, que promueven la hiperfosforilación de la proteína tau en ratones C57BL/6 adultos-jóvenes.

**Objetivo:** Examinar el efecto de la obesidad generada por una dieta alta en grasas sobre la activación de GSK3- $\beta$  y en la fosforilación tau, en homogeneizados de cerebros de ratones C57BL/6 en edad adulta-joven.

**Métodos:** Los ratones (n= 3 por grupo) fueron alimentados con una de dos dietas controladas durante 8 semanas: (1) dieta control, o (2) dieta alta en grasa. Los niveles de fosforilación de GSK-3 $\beta$  y tau en homogeneizados de cerebro de ratón fueron medidos mediante Western blot.

**Resultados:** GSK-3 $\beta$  total, tau total y tau p-Thr231 no presentaron variaciones significativas entre grupos. En tanto, GSK-3 $\beta$  p-Ser9 y tau p-Thr205 no pudieron ser analizadas por falta de señal quimioluminiscente en sus Western blot.

**Conclusión:** La hipótesis no se cumple, sin embargo, se observó una tendencia no estadísticamente significativa del aumento de tau total y tau p-Thr231 con la dieta alta en grasa.

**Palabras clave:** Tau, GSK-3 $\beta$ , DAG, Obesidad, Neurodegeneración.

## **ABSTRACT: “EFFECT OF OBESITY INDUCED BY A HIGH-FAT DIET ON THE DEGREE OF TAU PROTEIN PHOSPHORYLATION IN YOUNG-ADULT C57BL/6 MICE”**

---

**Background:** Obesity is an alarmingly increasing global public health issue, due its comorbidities, that include increased risk for the development of neurodegenerative disorders like tauopathies. Studies suggest that obesity associated with the consumption of high-fat diets can promote tau hyperphosphorylation in adults, since lipid peroxidation products, can activate GSK-3 $\beta$  and promote tau phosphorylation and early neurodegeneration. However, the mechanisms of how nutrients and obesity can affect the risk of developing dementia are still unclear.

**Hypothesis:** Obesity induced by a high-fat diet results in early activation of neurodegenerative pathways, which promote hyperphosphorylation of tau protein in young-adult C57BL/6 mice.

**Aim:** To examine the effect of obesity generated by a high-fat diet on the activation of GSK3- $\beta$  and on the phosphorylation of tau, in homogenates from the brains of C57BL/6 mice in young-adult age.

**Methods:** Mice (n=3 per group) were fed one of two controlled diets for 8 weeks: (1) control diet, or (2) high-fat diet. The levels of GSK-3 $\beta$  and tau phosphorylation in mouse brain homogenates were measured by Western blot.

**Results:** Total GSK-3 $\beta$ , total tau and tau p-Thr231 did not present significant variations between groups. Meanwhile, GSK-3 $\beta$  p-Ser9 and tau p-Thr205 could not be analyzed due to the lack of chemiluminescent signal in their Western blots.

**Conclusion:** The hypothesis is not fulfilled, however, a non-statistically significant trend of the increase of tau total and tau p-Thr231 with the high-fat diet was observed.

**Keywords:** Tau, GSK-3 $\beta$ , HFD, Obesity, Neurodegeneration.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Obesidad

La obesidad es definida como la acumulación anormal o excesiva de grasa, como consecuencia de un desbalance energético positivo sostenido en el tiempo, que resulta en un aumento excesivo de peso que puede ser perjudicial para la salud (Astrup et al., 2008; Hartroft, 1960; Romieu et al., 2017). Generalmente, se utiliza el índice de masa corporal (IMC) para estimar si una persona adulta presenta una situación nutricional normal ( $IMC \geq 18.5 \text{ kg/m}^2$ ), sobrepeso ( $IMC \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ ) u obesidad ( $IMC \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ ) (Whitmer et al., 2008). El año 2016, la Organización Mundial de la Salud reportaba que más de 1.9 billones de adultos presentaban sobrepeso y más 650 millones obesidad en el mundo (WHO, 2021). Mientras en Chile un 31.2% de la población presentaba sobrepeso y un 42.9% obesidad, posicionando al país como uno con las mayores tasas de sobrepeso y obesidad de la OCDE (de Salud Pública, 2017; Hewlett, 2019).

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la que se relacionan determinantes genéticos e individuales, como también factores ambientales, culturales y sociales que pueden inducir cambios en los patrones alimentarios y de actividad física (WHO, 2021). En este sentido, la transición alimentaria de dietas tradicionales ricas en cereales y hortalizas a dietas con alto contenido en azúcar, sodio y grasas saturadas (GS) junto con el aumento del sedentarismo, podrían explicar la actual epidemia de obesidad en el mundo (Astrup et al., 2008; Jaacks et al., 2019; Popkin et al., 2012). A nivel mundial, una de las principales causas del sobrepeso y la obesidad es el consumo de una dieta rica en grasas (DAG). Los niveles crónicamente elevados de ácidos grasos libres (AGL) circulantes causan inflamación y estrés oxidativo a nivel tisular y sistémico, lo que desempeña un papel importante en la resistencia a la insulina (RI) (Barazzoni et al., 2018; Pugazhenthii et al., 2017). Por ejemplo, Avtanski et al., 2019, investigaron el efecto al administrar durante 9 semanas una DAG de 60% de energía proveniente de grasas, sobre los parámetros de inflamación y RI en ratones macho C57BL/6J de 6 semanas de edad. Los resultados indican que los ratones alimentados con DAG mostraron acumulación de lípidos hepáticos y presencia de inflamación crónica evidenciada por una mayor incidencia de estructuras en forma de corona (CLS por sus siglas en inglés) debido a la infiltración de monocitos y macrófagos en el tejido adiposo blanco y niveles basales elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes como: el factor de necrosis tumoral alfa



(TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), leptina, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y resistina, en comparación a los que siguen una dieta regular. Los ratones con DAG también mostraron un índice de verificación de sensibilidad a la insulina cuantitativo más bajo (QUICKI por sus siglas en inglés) y valores de índice de resistencia a la insulina HOMA más altos (HOMA-IR) y un porcentaje de sensibilidad HOMA más bajo (HOMA-%S). Sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa de los HOMA-%  $\beta$ -células (HOMA-%B) de células  $\beta$  del páncreas entre los grupos de ratones DAG y con dieta regular. En otro estudio realizado por Li J., et al., 2020, se utilizaron cuatro cepas de ratones (Kunming, C57BL/6, BALB/c e ICR) alimentados con DAG (53% de kcal de grasa) durante un período de diez semanas para desarrollar obesidad. Dentro de los resultados obtenidos se observó que las cuatro cepas de ratones presentaron hígado y tejido adiposo más pesados y con células adiposas hipertrofiadas, en comparación con sus respectivos controles con dieta estándar. Al evaluar la prueba de tolerancia oral a la glucosa y la prueba de tolerancia a la insulina en las cuatro cepas de ratón se obtuvo que la DAG interfirió en el metabolismo de la glucosa mostrando un área bajo la curva (ABC) significativamente más alta con respecto al ABC de sus controles respectivos.

La preocupación asociada con la obesidad radica en los efectos directos de esta sobre la salud y la relación de esta con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensión arterial, cáncer, demencias, entre otras (Hartroft, 1960; WHO, 2021). Las reacciones desencadenadas por la obesidad pueden presentarse en el cerebro como demencia u otros trastornos mentales como la enfermedad de Alzheimer (EA). Estas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la formación de placas de  $\beta$ -amiloide, aumento de la inmunoreactividad de la ubiquitina, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), neuroinflamación, astrocitosis, deterioro microvascular, interrupción de la maquinaria de autofagia y acumulación celular de proteínas mal plegadas producto de la hiperfosforilación de proteína tau. Este mal plegamiento produce lesiones en el citoesqueleto que inducen la atrofia de las estructuras temporales mediales y corticales consistente en la pérdida de neuronas y terminales sinápticas (Terzo et al., 2021).

## **1.2 Tauopatías y enfermedad de Alzheimer (EA)**

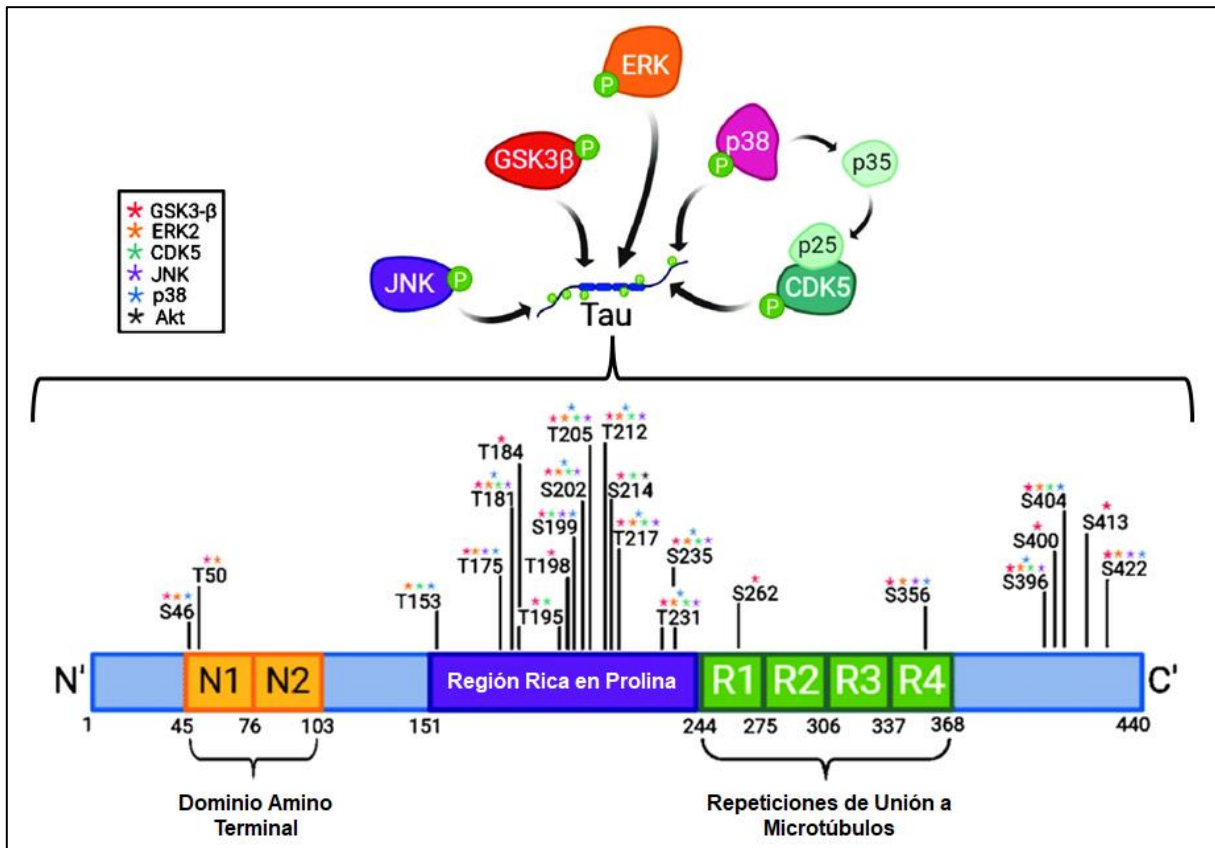
Las tauopatías corresponden a un grupo de trastornos neurodegenerativos progresivos relacionados a la edad, que se definen patológicamente por la presencia de agregados de proteína tau en el cerebro (neuronas, células gliales y espacio extracelular), con síntomas de demencia y parkinsonismo. Como tauopatías se incluyen la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la enfermedad de los granos argirofílicos, la EA y la encefalopatía traumática crónica (Lee y Leugers, 2012; Orr et al., 2017; Zhang et al., 2022). La demencia asociada a la edad más común es la EA, que representa aproximadamente el 60-80% de los casos y que en 2015 se estimaba afectaba a 46.8 millones de personas en el mundo (Alzheimer's Association, 2023; Krstic y Knuesel, 2013; Prince et al., 2015). Esta enfermedad se caracteriza por pérdida de memoria y la reducción de las funciones cognitivas causadas por disfunción neuronal y muerte celular (Picone et al., 2020) provocada por la acumulación extracelular de placas  $\beta$ -amiloides y la acumulación intracelular de depósitos fibrilares de tau hiperfosforilada (NFTs por sus siglas en inglés) en el cerebro (Gómez-Ramos et al., 2002; Q. Liu et al., 2005). La gravedad de los síntomas de demencia en la EA se correlaciona directamente con el número de NFTs (F. Liu et al., 2006).

### **1.3 Tau, fosforilaciones y citoesqueleto**

Las proteínas tau (del inglés, unidad asociada a tubulina) son un grupo de seis isoformas de proteínas producidas por el *splicing* alternativo del gen MAPT (Iqbal et al., 2016). Ha sido descrita como un regulador crucial en el ensamblaje de los microtúbulos dada su función de promover el autoensamblaje de los microtúbulos por la tubulina y estabilizar los ya formados, por ende, es una proteína esencial para la estabilización del citoesqueleto neuronal (Cook et al., 2015; Devos et al., 2017; Iqbal et al., 2016; Lee y Leugers, 2012; F. Liu et al., 2006; Q. Liu et al., 2005). La promoción del ensamblaje de microtúbulos por tau está regulada por su grado de fosforilación, pero su hiperfosforilación suprime esta actividad (Iqbal et al., 2016). La unión de tau a los microtúbulos ocurre mediante una interacción electrostática en donde el sitio de unión a la proteína tau en los microtúbulos está localizado en el extremo carboxilo terminal, el cual es ácido. Al unir grupos fosfatos (de carácter ácido) a la proteína tau se dificulta la unión de esta con los microtúbulos (Lee y Leugers, 2012).

En la EA, tau presenta 6 a 10 grupos fosfato por molécula, es decir, un número mayor a los 2 a 3 grupos fosfato presentes en condiciones normales (Kopke et al., 1993; Ksiezak-Reding et al., 1992). Una fosforilación anormal y fundamentalmente de los aminoácidos

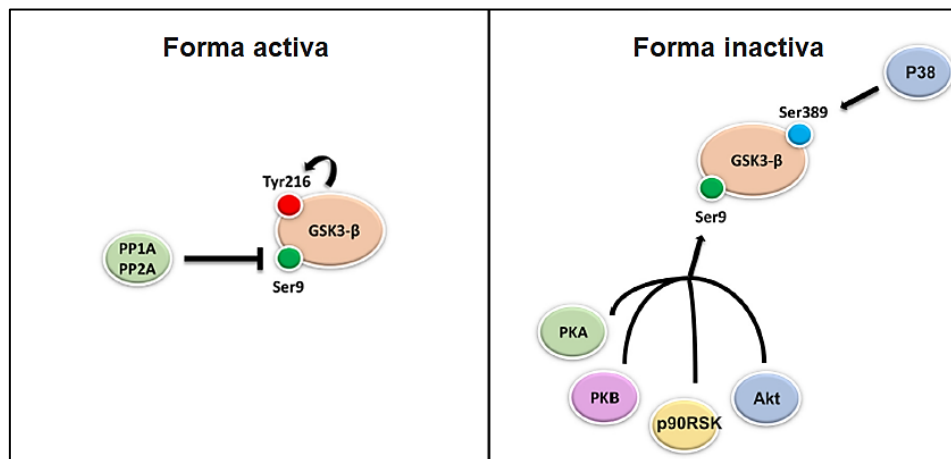
Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Ser231/Thr235, Ser262/Ser356 y Ser404, conlleva a que tau adquiera la capacidad de secuestrar a tau normal desde los microtúbulos, alterando el citoesqueleto y conduciendo a la degeneración neuronal (Lee y Leugers, 2012; F. Liu et al., 2006).



**Figura 1. Regulación de la fosforilación de tau.** El diagrama destaca los sitios de fosforilación identificados en tau que han demostrado ser fosforilados por las quinazas: GSK-3 $\beta$ , ERK2, CDK5, JNK, y P38. GSK-3 $\beta$  y CDK5 se han relacionado con la hiperfosforilación de tau en la EA. Adaptado de Hole y Williams, 2020.

Existe una variedad de enzimas serina/treonina quinazas capaces de fosforilar tau (Fig.1), como: GSK-3 $\beta$ , CDK5, MAPK (ERK), JNK (SAPK) y P38, siendo GSK-3 $\beta$  la principal quinasa que fosforila tau en cultivos celulares de neuronas y cerebro de rata (Lee y Leugers, 2012; Muñoz-Montaño et al., 1997; Patil y Chan, 2005; Špolcová et al., 2014). La fosforilación de Ser9 en GSK-3 $\beta$  por la serina/treonina quinasa (Akt) inhibe la actividad quinasa de GSK-3 $\beta$  (Fig. 2), por ende, la fosforilación atenuada de Ser9 aumenta la actividad quinasa de GSK-3 $\beta$  hacia tau (Špolcová et al., 2014). La fosforilación mediada por GSK-3 $\beta$  en el residuo Thr231

de tau disminuye en un 25% la unión de tau con los microtúbulos, adicionalmente esta quinasa puede fosforilar a tau en Ser199, Ser396 y Ser 413 (F. Liu et al., 2006). Estudios epidemiológicos sugieren que la obesidad y las DAG pueden aumentar significativamente el riesgo de EA (Alford et al., 2018; Picone et al., 2020; Pugazhenthii et al., 2017; Xu et al., 2011). En otros estudios se ha demostrado, que tanto la insulina como los receptores de insulina están presentes en el cerebro. Estos receptores se expresan en gran medida en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) (Chatterjee et al., 2019). La señalización de insulina consiste en un eje insulina-IR/IGF-1R-IRS, mediante el cual la unión de la insulina a la subunidad alfa extracelular del receptor o IGF-1R inicia una serie de autofosforilaciones de Tyr, activando al sustrato del receptor de insulina (IRS por sus siglas en inglés). El IRS activado recluta a la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K por sus siglas en inglés), activando así una cascada de señalización que involucra a la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1 por sus siglas en inglés) que a su vez fosforila a la Akt en los residuos Thr308 y Ser473. La Akt activada se une a la glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), induciendo su transporte a la membrana celular para fosforilar su sitio activo (extremo N-terminal) en Ser9 inactivándolo. En el contexto de la regulación de la glucosa, GSK-3 $\beta$  promueve la síntesis de glucógeno, y también es una de las principales quinasas responsables de la fosforilación de tau (Petrov et al., 2015; Zhang et al., 2018).



**Figura 2. Regulación de la actividad de GSK3- $\beta$ .** GSK3- $\beta$  existe en forma activa e inactiva dependiendo de su estado de fosforilación, el cual es modulado por serina/treonina y tirosina quinasas y proteínas fosfatasas 1A (PP1A) y 2A (PP2A), en respuesta a estímulos externos. GSK-3 $\beta$  se activa por autofosforilación en Tyr216 y se inactiva por fosforilación de Ser9 por: AKT, proteína quinasa A (PKA) y B (PKB), y P90RSK; o por fosforilación de Ser389 por P38. Adaptado de Lauretti et al., 2020.

Debido a la relevancia de la insulina para el mantenimiento de la función y la homeostasis del cerebro, no sorprende que las alteraciones en las vías de señalización de la insulina se asocien con la EA (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). Se ha observado que en el hipocampo humano la RI se acompaña de un aumento de la fosforilación en el residuo Ser636 del IRS-1, esta alteración de la señalización de la insulina cerebral se ha asociado con el deterioro cognitivo en modelos animales y humanos; uno de los mecanismos subyacentes a este evento involucra a la GSK-3 $\beta$ , que es regulada por la insulina a través de la vía Akt (Chatterjee et al., 2019; Gonçalves et al., 2019; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). La resistencia a la insulina conduce a la activación aberrante de GSK-3 $\beta$  y a la inhibición de la desfosforilación de tau mediada por AMPK, lo que desencadena la hiperfosforilación de tau (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). En un estudio realizado por Xiong et al., 2022, se administró una DAG a ratones transgénicos pR5 hembra (proveniente de ratones C57BL/6) que expresaban la proteína tau humana mutante P301L y ratones C57BL/6 de fenotipo salvaje (WT por sus siglas en inglés) a partir de la semana 8 hasta las 38 semanas de edad. Obteniendo como resultado que los ratones alimentados con DAG tenían una sensibilidad a la insulina alterada potenciada por el genotipo. Además, la DAG a largo plazo facilitó el desarrollo de RI periférica y aumentó los cambios de comportamiento cognitivo y la patología tau en ratones transgénicos pR5. Los ratones transgénicos pR5 desarrollaron gradualmente la proteína tau fosforilada en el área CA1 del hipocampo, la amígdala y el lóbulo frontal del cerebro desde aproximadamente los 6 meses de edad, formando NFT y mostrando un comportamiento mental anormal y deterioro de la capacidad de aprendizaje espacial. Los análisis de Western blot (WB) de homogeneizados de cerebro mostró un aumento significativo en los niveles de proteína tau total y proteína tau fosforilada en p-Thr231 y p-Ser396 en ratones P301L y WT alimentados con DAG, en comparación con ratones WT tratados con una dieta estándar.

#### **1.4 Obesidad y neurodegeneración**

La vejez y la genética son las causas más comunes para el desarrollo de demencia, sin embargo, factores como la diabetes, obesidad o sedentarismo podrían contribuir en su aparición temprana (Leboucher et al., 2013; Petrov et al., 2015). Un estudio longitudinal realizado por Whitmer et al., 2008, concluyó que la obesidad central en la mediana edad aumenta el riesgo de demencia independientemente de la diabetes y las comorbilidades cardiovasculares.

Xu et al., 2011, estudiaron la relación entre sobrepeso y demencia, comparando individuos de mediana edad con un índice de masa corporal normal (IMC 20-25), con sobrepeso (IMC 25-30) u obesidad (IMC > 30), evidenciando que los dos últimos poseían una razón de probabilidad (OR, por sus siglas en inglés) de desarrollo de demencia de 1.71 y 3.88, respectivamente. Asimismo, se observó que el riesgo disminuye al disminuir el IMC, concluyendo que el sobrepeso y la obesidad en la adultez media aumentan de forma independiente el riesgo de desarrollar demencia. Por su parte Zhuang et al., 2021, mediante análisis de aleatorización mendeliana de dos muestras, metanálisis de interacción proteína-proteína y de red, concluyeron que la obesidad en la mediana edad podría aumentar el riesgo de EA y que el prepro péptido CART (CARTPT) podría ser un factor clave en la vinculación de ambas enfermedades.

### **1.5 DAG y neurodegeneración**

Una DAG es aquella en que al menos el 35% del total de calorías se consume a partir de grasas, tanto insaturadas como saturadas (Krisanits et al., 2020). Estas dietas se consideran como una de las mayores causas de sobrepeso y obesidad (Pugazhenthí et al., 2017), asimismo, se ha observado que el consumo de cierto tipo de grasas en lugar de la ingesta total de grasas en sí, parecen influir en el envejecimiento cognitivo (Okereke et al., 2012). Se ha observado que niveles crónicamente elevados de ácidos grasos libres (AGL) circulantes se han relacionado con un mayor riesgo de deterioro cognitivo (Pugazhenthí et al., 2017).

Laitinen et al., 2006, examinaron el efecto de la ingesta de grasas en 1449 pacientes desde la mediana edad por 21 años y notaron que la ingesta moderada de grasas insaturadas en la mediana edad es protectora, mientras que una ingesta moderada de GS puede aumentar el riesgo de demencia y EA, especialmente entre los portadores de ApoE4.

Estudios de Patil y Chan, 2005, examinaron el rol de los ácidos grasos (AG) en la hiperfosforilación de tau en neuronas corticales primarias y astrocitos de rata tratados con ácidos grasos saturados (AGS), ácido palmítico o esteárico durante 24 horas. El tratamiento directo de neuronas con AGS no evidenció cambios en los niveles de fosforilación de tau. No obstante, en el caso de las tratadas con AGS y medio acondicionado de astrocitos, se observó hiperfosforilación de tau en fosfoepítotos específicos de la EA. Lo anterior, podría ser revertido al utilizar un tratamiento conjunto con un antioxidante como la N-acetilcisteína, sugiriendo que

los AGS pueden promover la hiperfosforilación de tau a través del estrés oxidativo mediado por los astrocitos. Mientras que Julien et al., 2010, observaron en ratones transgénicos triples (3xTg-AD) que una ingesta dietética alta en grasas junto a un bajo consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 promueven la acumulación de marcadores neuropatológicos, *ergo*, una neuropatología similar a la EA.

Petrov et al., 2015, y Nakandakari et al., 2019, evaluaron los efectos de una DAG en el hipocampo de ratones C57BL/6 relativamente jóvenes tras una exposición temporal larga y corta a la dieta, respectivamente. Tras una exposición breve de 10 días se evidenció la activación de señales inflamatorias, apoptóticas y de estrés del retículo endoplasmático (Nakandakari et al., 2019). Por su parte, los estudios relacionados a una exposición prolongada de 6 meses concluyeron que en dicho periodo se desarrollan déficit de memoria independiente de  $\beta$ -amiloide, síndrome metabólico y reducción del metabolismo de OXPHOS (Petrov et al., 2015).

La disfunción cognitiva debida a la obesidad pudiera explicarse con base en la capacidad de los AGS para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) e inducir una respuesta inflamatoria a través de los receptores tipo toll 4 (TLR4 por sus siglas en inglés) en el hipotálamo (Pugazhenthii et al., 2017). Se ha observado que el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y la acroleína, productos de la peroxidación de lípidos de membrana, se encuentran elevados en el cerebro de pacientes con EA y contribuyen a la activación de quinasas como ERK, GSK-3 $\beta$ , p38 y JNK, junto con su capacidad para fosforilar a proteínas como tau en residuos esenciales para la estabilización del citoesqueleto neuronal (Gómez-Ramos et al., 2002; Q. Liu et al., 2005; Patil y Chan, 2005; Zhu et al., 2000). Mattson et al., 1997, estudiaron el efecto de 4-HNE sobre la fosforilación de tau en cultivo de neuronas del hipocampo de rata, utilizando anticuerpos anti-tau fosforilada en Ser202. Los autores observaron que el tratamiento con 4-HNE aumenta moderadamente los niveles basales tau fosforilada y previene la desfosforilación de tau por fosfatasa alcalina en neuronas pretratadas con ácido okadaico, lo que sugiere que 4-HNE participa en fosforilación anormal de tau en la EA. Mientras Gómez-Ramos et al., 2002, estudiaron el efecto de la acroleína, un producto de peroxidación del ácido araquidónico (AA), sobre la fosforilación de tau en cultivos de neuronas corticales de ratón y células de neuroblastoma humano. Ellos evidenciaron que la activación de GSK-3 $\beta$  debido al estrés oxidativo inducido por la acroleína promueve la fosforilación de tau y que al emplear un

inhibidor de GSK-3 $\beta$  como el litio los niveles de fosforilación disminuyen. Estos resultados indican que el estrés oxidativo y la formación posterior de productos de peroxidación de lípidos pueden contribuir a la fosforilación de la proteína tau y en consecuencia al desarrollo de tauopatías.

En la presente memoria se tiene por objetivo evaluar el estado de fosforilación en distintos residuos aminoacídicos de la proteína tau en homogeneizados de cerebros de ratones adultos obesos, sometidos a DAG, que indiquen la aparición a edad temprana (14 semanas) del daño neuronal presente en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. Así como medir la activación de GSK-3 $\beta$  como marcadores moleculares que están dando cuenta de la hiperfosforilación de tau que podrían llevar a neurodegeneración.



## **2. HIPÓTESIS**

---

“La obesidad inducida por una dieta alta en grasas produce la activación temprana de vías neurodegenerativas, que promueven la hiperfosforilación de la proteína tau en ratones C57BL/6 adultos-jóvenes”.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1 Objetivo general**

Examinar el efecto de la obesidad generada por una dieta alta en grasas sobre la activación de proteínas quinasas como GSK-3 $\beta$  y en la fosforilación de la proteína tau, en homogeneizados de cerebros de ratones C57BL/6 en edad adulta-joven.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a. Determinar los niveles de GSK-3 $\beta$  total y fosforilada en el residuo Ser9, que inhibe la actividad de la principal quinasa que fosforila a tau, en homogeneizados de cerebro de ratón con obesidad inducida.
- b. Determinar cambios en los niveles de la proteína tau total y fosforilada en los residuos Thr205 y Thr231, que son marcadores tempranos de neurodegeneración, en homogeneizados de cerebro de ratón con obesidad inducida.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Materiales

#### **Abcam, Cambridge, UK:**

- Anticuerpo secundario anti-cabra IgG (HRP), hecho en conejo, AB97100.

#### **Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA:**

- Anticuerpo primario anti-GSK-3 $\beta$  fosforilada (Ser9), hecho en conejo, 5558.
- Anticuerpo primario anti-Tau, hecho en conejo, 46687.
- Anticuerpo primario anti-Tau fosforilada (Thr205), hecho en conejo, 49561.

#### **Merck, Darmstadt, Alemania:**

- Acrilamida, 110784.
- Amonio peroxodisulfato, 101201.
- Etanol, 100983.
- Glicina, 104201.
- Membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran®, GE10600001.
- Metanol, 106009.
- N,N'-metilendiacrilamida, 110897.
- N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED), 110732.
- Tris(hidroximetil)aminometano, 108382.
- Tween 20, 822184.

#### **Novus Biologicals, Littleton, CO, USA:**

- Anticuerpo primario anti-Tau fosforilada (Thr231), hecho en conejo, NBP2-67574.

#### **R&D Systems, Minneapolis, MN, USA:**

- Anticuerpo secundario anti-conejo IgG (HRP), hecho en cabra, HAF008.
- Anticuerpo primario anti-GAPDH, hecho en cabra, AF5718.

#### **Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA:**

- Anticuerpo primario anti-GSK-3 $\beta$ , hecho en conejo, SAB5700767.

#### **Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA:**

- Estándar de proteínas preteñidas PageRuler™, de 10 a 180 kDa, 26616.
- Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™, 223227.
- Minipastillas inhibidoras de fosfatasas Pierce, A32957.
- Pastillas inhibidoras de proteasas Pierce™, A32963.
- Placas de poliestireno de 96 pocillos Pierce™, 15041.
- Sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal™ West Femto, 34095.
- Tampón de lavado de inmunotransferencia (Western blot) Restore™ PLUS, 46430.

#### **Winkler, Santiago, Chile:**

- Albúmina de suero bovino (BSA), BM-0150.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Animales**

En la investigación, se utilizaron cerebros de ratón donados por el Dr. Diego García Díaz, investigador principal del proyecto “EXTRACTS OF CHILEAN NATIVE FRUITS INHIBBIT INFLAMMATORY MECHANISMS INVOLVED IN OBESITY DEVELOPMENT”. Proyecto realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y financiado por CONICYT (proyecto FONDECYT 11110219).

Dichos cerebros provenían de ratones macho *Mus musculus* C57BL/6 de 24 semanas y un peso de  $\pm 20$  g, los cuales se obtuvieron del Bioterio del Departamento de Nutrición (Facultad de Medicina, Universidad de Chile). Estos se mantuvieron en una instalación para animales co-alojados de 3-4 ratones con temperatura ambiente controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclos luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso a comida y agua. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Chile. Se adjuntan autorización de Bioética CBA #0944 FMUCH (Anexo 1).

**4.2.2 Tratamiento dietario de los animales.** A las 5 semanas, tras el destete, a los animales se les administró una dieta estándar (*D12328, Research Diets, INC, U.S.A*) por un periodo de 3 semanas y finalmente, los ratones fueron asignados de forma aleatoria a uno de los dos grupos experimentales:

- a) **DC:** Dieta control.

b) **DAG:** Dieta alta en grasa.

El grupo DC recibió una dieta certificada normal (*D12328, Research Diets INC, U.S.A*), cuyo aporte calórico consiste en un 10.5% grasas, 73.1% carbohidratos y 16.4% proteínas, entre otros nutrientes (Tabla 1). En tanto, el grupo DAG recibió una dieta certificada alta en grasa (*D12330, Research Diets INC, U.S.A*), cuyo aporte calórico consiste en un 58% grasa, 25.5% carbohidratos y 16.4% proteínas, entre otros nutrientes (Tabla 2). Ambos grupos experimentales recibieron sus correspondientes dietas por un periodo de 16 semanas (Fig. 3).

A los animales de ambos grupos se les realizó un seguimiento de la ganancia de peso y otros parámetros nutricionales, dichos datos se encuentran disponibles en Duarte et al., 2021.

**Tabla 1.** Composición nutricional y aporte calórico de la dieta control.

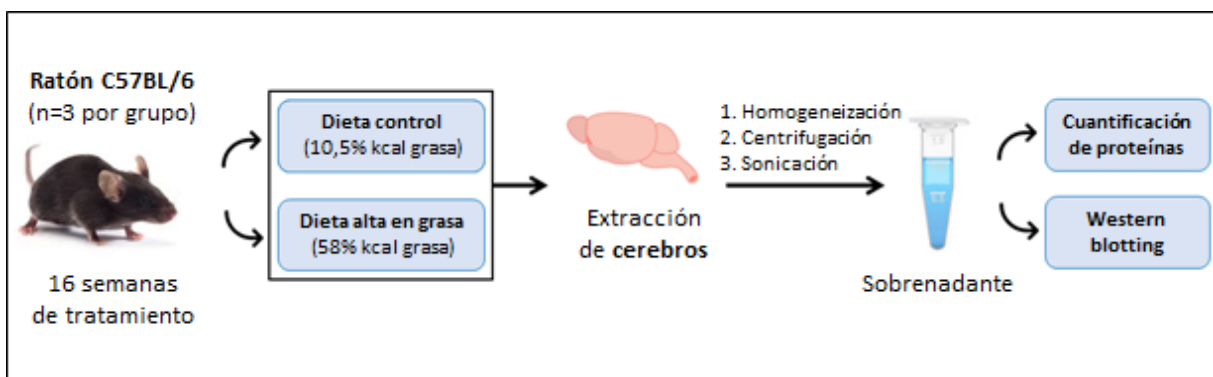
<b>DIETA CONTROL</b>		
	<b>%g totales</b>	<b>%kcal totales</b>
Proteínas	16.8	16.4
Carbohidratos	74.3	73.1
Grasas	4.8	10.5
Total		100
kcal/g	4.07	
<b>Ingredientes</b>	<b>G</b>	<b>Kcal</b>
Caseína	228	912
DL-Metionina	2	0
Maltodextrina	170	680
Maicena	835	3340
Sacarosa	0	0
Aceite de soja	25	25
Aceite de coco	40	360
Mineral Mix S10001	40	0
Bicarbonato de sodio	10.5	0
Citrato de potasio	4	0
Vitamin mix V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Colorante amarillo	0.1	0
Total	1336.6	5557

Adaptado de ResearchDiets, 2006.

**Tabla 2.** Composición nutricional y aporte calórico de la dieta alta en grasa.

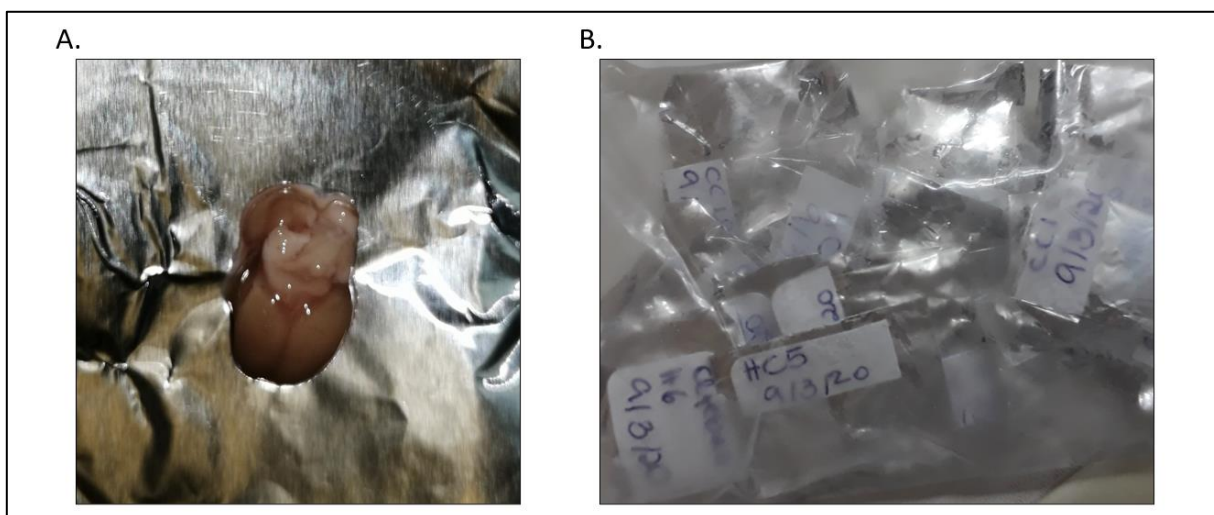
<b>DIETA ALTA EN GRASA</b>		
	<b>%g totales</b>	<b>%kcal totales</b>
Proteínas	23.0	16.4
Carbohidratos	35.5	25.5
Grasas	35.8	58.0
Total		100
kcal/g	5.56	
<b>Ingredientes</b>	<b>G</b>	<b>Kcal</b>
Caseína	228	912
L-Metionina	2	0
Maltodextrina	170	680
Maicena	175	700
Sacarosa	0	0
Aceite de soja	25	225
Aceite de coco	333.5	3001.5
Mineral Mix S10001	40	0
Bicarbonato de sodio	10.5	0
Citrato de potasio	4	0
Vitamin mix V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Colorante azul	0.05	0
Colorante rojo	0.05	0
Total	1000.1	5558.5

Adaptado de ResearchDiets, 2006.



**Figura 3.** Representación esquemática del diseño experimental utilizado.

**4.2.3 Procedimiento previo de preparación de las muestras.** Para la recolección de los tejidos de interés, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina-xilazina (91 y 9 mg/kg, respectivamente) por vía intraperitoneal (IP) y luego sacrificados mediante dislocación cervical. Las cabezas fueron congeladas en nitrógeno líquido y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la posterior extracción de los cerebros para su almacenamiento y uso (Fig. 4).



**Figura 4. Cerebros de ratón C57BL/6.** (A) Cerebro de ratón. (B) Cerebros de ratón almacenados en sobres de papel de aluminio y bolsa plástica a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con sus correspondientes identificaciones.

**4.2.4 Preparación de las muestras.** Para su análisis, los cerebros obtenidos y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron pesados y sumergidos en tampón de lisis RIPA (0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% desoxicolato de sodio, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, e inhibidores de proteasas y fosfatasa según indicaciones estándar del fabricante) a  $4^{\circ}\text{C}$  para su homogeneización. Se consideró adicionar 10 volúmenes de tampón de acuerdo con el peso del tejido (10 mg tejido/100  $\mu\text{l}$  de buffer). Los homogeneizados obtenidos traspasaron a tubos centrífuga de 1.5 ml. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para remover restos celulares (Fig. 3). Finalmente, los sobrenadantes recuperados fueron sonicados por 10 min, alícuotados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

**4.2.5 Cuantificación de proteínas.** Se determinó la concentración de proteínas presente en los sobrenadantes de homogeneizados del cerebro, mediante el empleo del kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™. Para las mediciones se preparó la curva estándar de BSA incluidas en el kit, en tanto que, las muestras fueron previamente diluidas 1:100 (o 1:50, dependiendo

de la muestra) en agua destilada para asegurar de mantenerse dentro del rango lineal del método (20–2000 µg/ml). Se siguieron las instrucciones estándar del fabricante para lecturas en microplaca sin realizar modificaciones a dicho protocolo. Las lecturas se realizaron mediante el lector de placas Infinite® PRO 200 (Tecan Group Ltd., Suiza) a 562 nm.

**Tabla 3.** Soluciones para preparar dos geles de Tris-glicina para electroforesis SDS-PAGE.

Componentes	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 5%
Agua destilada (ml)	3.3	2.7
30% Acrilamida – 0.8% Bisacrilamida (ml)	4.0	0.67
1.5 M Tris, pH 8.8 (ml)	2.5	-
1.0 M Tris, pH 6.8 (ml)	-	0.5
10% Dodecilsulfato sódico	0.1	0.04
10% Persulfato de amonio (ml)	0.1	0.04
TEMED (ml)	0.004	0.004

Adaptado de Green y Sambrook, 2012.

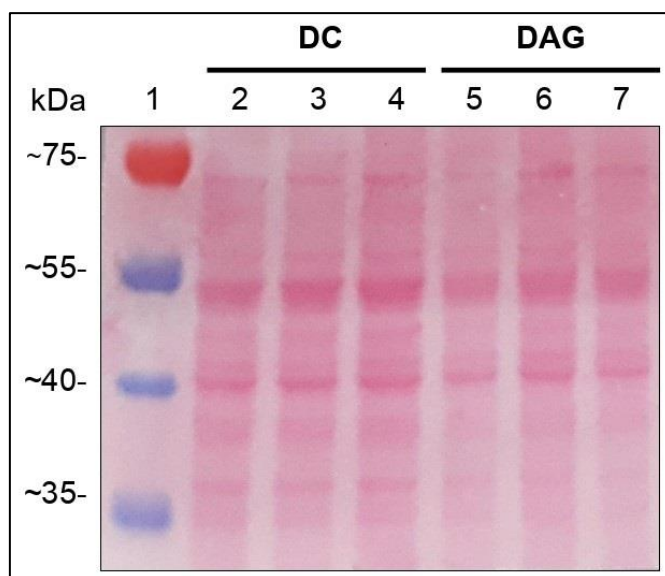
**4.2.6 Determinación de fosforilación de GSK-3β y Tau.** Se realizó una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) en condiciones reductoras usando el gel concentrador al 5% de acrilamida/bisacrilamida y el gel separador al 12% de acrilamida/bisacrilamida (Tabla 3). En base a las concentraciones de proteína estimada para cada muestra, se calculó la cantidad de muestra y tampón de carga 4 X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol, azul bromofenol) necesarios para cargar 30 µg de proteína por bolsillo de gel. Se usaron 5 µl de estándar de peso molecular PageRuler™ (#26616, Thermo Fisher Scientific, U.S.A) por gel. Para la electroforesis se utilizó un tampón de electroforesis (192 mM glicina, 25 mM Tris-base, 0.1% SDS) y un voltaje de 100 V para el gel concentrador y 125 V para el separador.

La electrotransferencia se realizó a 300 mA por 2 horas a 4°C utilizando un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) y membranas de nitrocelulosa. Para confirmar la correcta transferencia de proteína a las membranas, estas se tiñeron con tinción rojo Ponceau (Fig. 5) y luego se lavaron por 5 minutos con TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0.1%, pH 7.6). Para el bloqueo de las membranas se utilizó leche descremada en polvo al 5% disuelta en TBS-T por 1 h en agitación constante y a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en TBS-T, para después incubar la membrana con los anticuerpos primarios anti-GSK-3β pSer9 (5558, Cell Signaling Technology, U.S.A) a dilución 1:1000, anti-GSK3-β (SAB5700767, Sigma-



Aldrich, U.S.A) a dilución 1:1000, anti-tau pThr205 (49561, Cell Signaling Technology, U.S.A) a dilución 1:1000, anti-tau pThr231 (NBP2-67574, Novus Biologicals, U.S.A) a dilución 1:1000, anti-tau (46687, Cell Signaling Technology, U.S.A) a dilución 1:1000, y anti-GAPDH (AF5718, R&D Systems, U.S.A) a dilución 1:1000 preparados en TBS-T. Se incubó durante toda la noche en agitación y 4°C. Posterior a esto, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T y se dejaron incubando con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) (HAF008, R&D Systems, U.S.A) a dilución 1:50.000 preparado en TBS-T, para todos los anticuerpos primarios excepto GAPDH. Para GAPDH se utilizó anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000 (AB97100, Abcam, U.K). Tras esto, Finalmente, se lavaron 3 veces por 10 min con TBS-T y se procedió a revelar las membranas.

Las diluciones de anticuerpos mencionadas corresponden a las concentraciones óptimas de trabajo a las que se llegó luego de titular cada uno de los anticuerpos utilizados. Asimismo, se optimizó el tiempo de adquisición de la señal quimioluminiscente necesario para los revelados.



**Figura 5. Membrana teñida con rojo Ponceau posterior a la electrotransferencia.** Orden de carga de izquierda a derecha: estándar de peso molecular (carril 1), homogeneizados de cerebro de ratones tratados con dieta control (DC, carriles 1-3) y con dieta alta en grasa (DAG, carriles 4-6). Cada homogeneizado corresponde a un animal diferente.

Para el revelado, se utilizó el sistema de detección por quimioluminiscencia SuperSignal™ West Femto con una solución de luminol/potenciador y una de peróxido de hidrógeno en relación 1:1. Para cada membrana (8 cm x 4 cm aprox.) se empleó 100 ul de cada solución. La señal quimioluminiscente fue capturada considerando un tiempo de adquisición de 2 min con el equipo Odyssey Fc (LICOR, Inc., U.S.A) y digitalizada mediante LI-COR Acquisition Software Version 1.1 (LICOR, Inc., U.S.A).

Como se requirió ensayar otros anticuerpos en la misma membrana, se realizó deshibridación. Para ello se realizó un lavado de 5 min a las membranas con el tampón de lavado Restore™ PLUS, luego se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T y se prosiguió con el protocolo de WB desde el bloqueo y utilizando un nuevo anticuerpo primario. El orden de ensayo de los anticuerpos en esta modalidad consistió probar primero las proteínas fosforiladas, luego las totales y finalmente el control de carga (GAPDH).

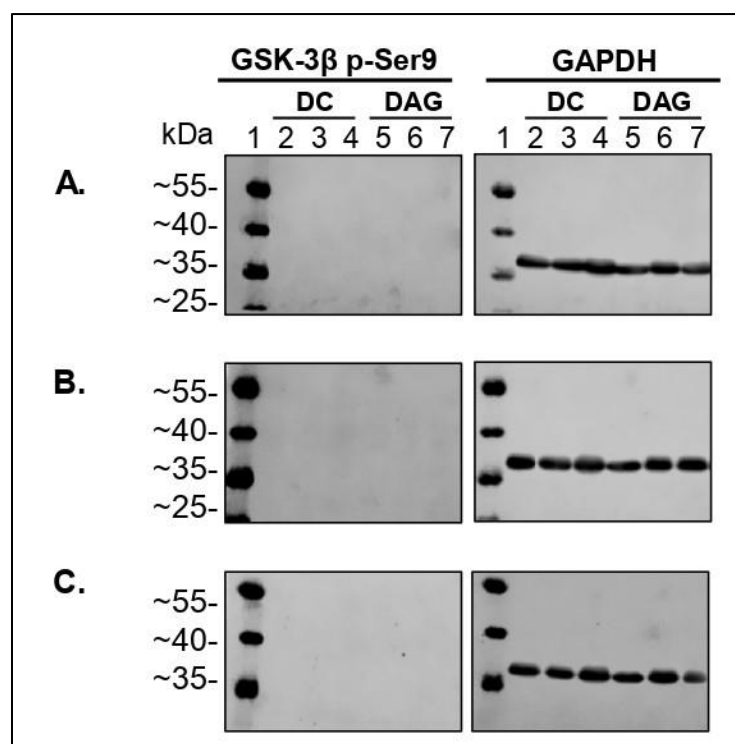
A partir de las imágenes capturadas, se determinaron los niveles de proteína mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ (NCBI), las mediciones se expresaron como unidades arbitrarias (UA) correspondientes a píxeles de la proteína de interés/píxeles de GAPDH.

**4.2.7 Análisis estadísticos.** Los resultados finales se expresaron como promedios  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) para 3 cerebros por grupo experimental (n=3). La diferencia entre grupos experimentales se evaluó mediante la prueba de t-test para datos no paramétricos y la prueba de Mann-Whitney. Se estableció un límite de confianza de 5% ( $p < 0,05$ ) (GraphPad Prisma Version 9.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cambios en los niveles de fosforilación de GSK-3 $\beta$

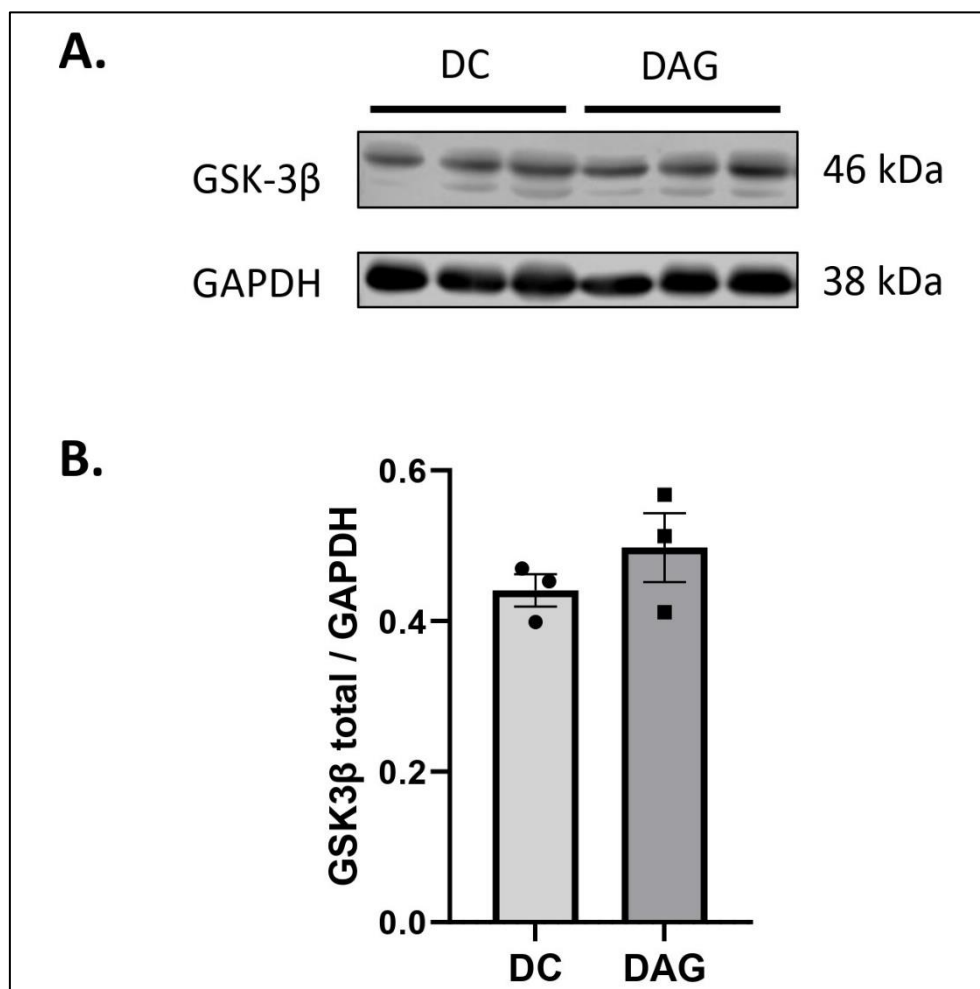
Con la finalidad de determinar el efecto de una DAG sobre la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$  fosforilada en Ser9) se cuantificó, mediante WB, la proteína fosforilada y total en los sobrenadantes de homogeneizados de cerebro ratón alimentados con DC y DAG (n=3 por grupo).



**Figura 6. Detección de GSK-3 $\beta$  fosforilada en Ser9 mediante WB por triplicado.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (DC, carriles 1-3) y dieta alta en grasa (DAG, carriles 4-6); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular (carril 1). La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-fosfo-GSK-3 $\beta$  (Ser9) 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. En los triplicados se detectó la banda la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa, pero no la de GSK-3 $\beta$  fosforilada.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras por triplicado muestran que, no se observó señal en las membranas incubadas con anticuerpo anti-GSK-3 $\beta$  fosforilada en Ser9 (Fig. 6).

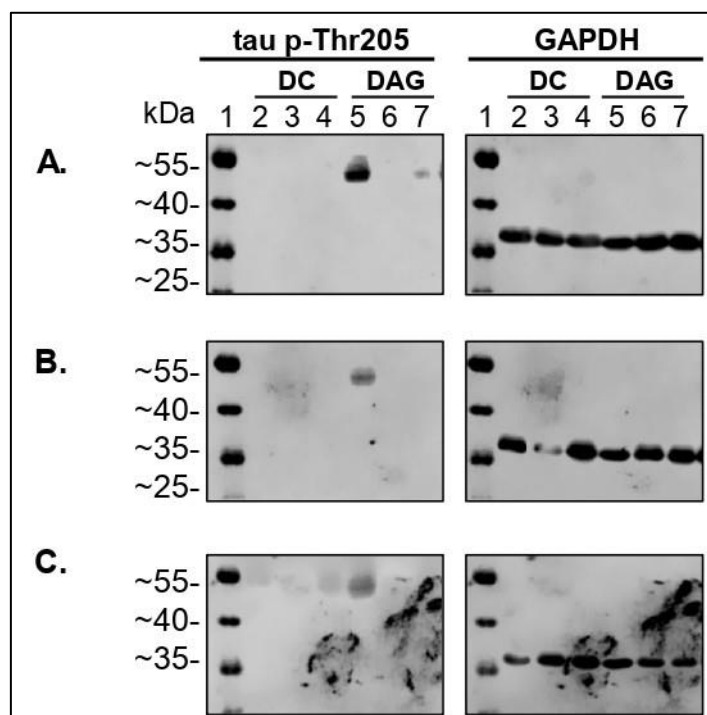
El análisis densitométrico y estadístico de las bandas de GSK-3 $\beta$  total mostró que tal como se esperaba, no hay diferencias significativas entre la DC y la DAG (Fig. 7). Por su parte, análisis densitométrico de la proteína fosforilada en Ser9 no se pudo realizar debido a la falta de datos que procesar y, en consecuencia, no se pudo realizar tampoco un análisis estadístico que permitiese establecer si efectivamente una DAG induce algún cambio en la fosforilación de la proteína.



**Figura 7. Cambios en GSK-3 $\beta$ , asociados a una DAG.** (A) Imagen representativa de WB contra GSK-3 $\beta$  total en los grupos estudiados: dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG). (B) Análisis densitométrico de las bandas, donde se utilizó GAPDH como control de carga. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  SEM de 3 animales por grupo experimental (barras), en tanto, cada punto corresponde al promedio del triplicado del parámetro analizado en un animal en particular de su correspondiente grupo experimental ( $p < 0,05$ ; t-test).

## 5.2 Cambios en la fosforilación de tau

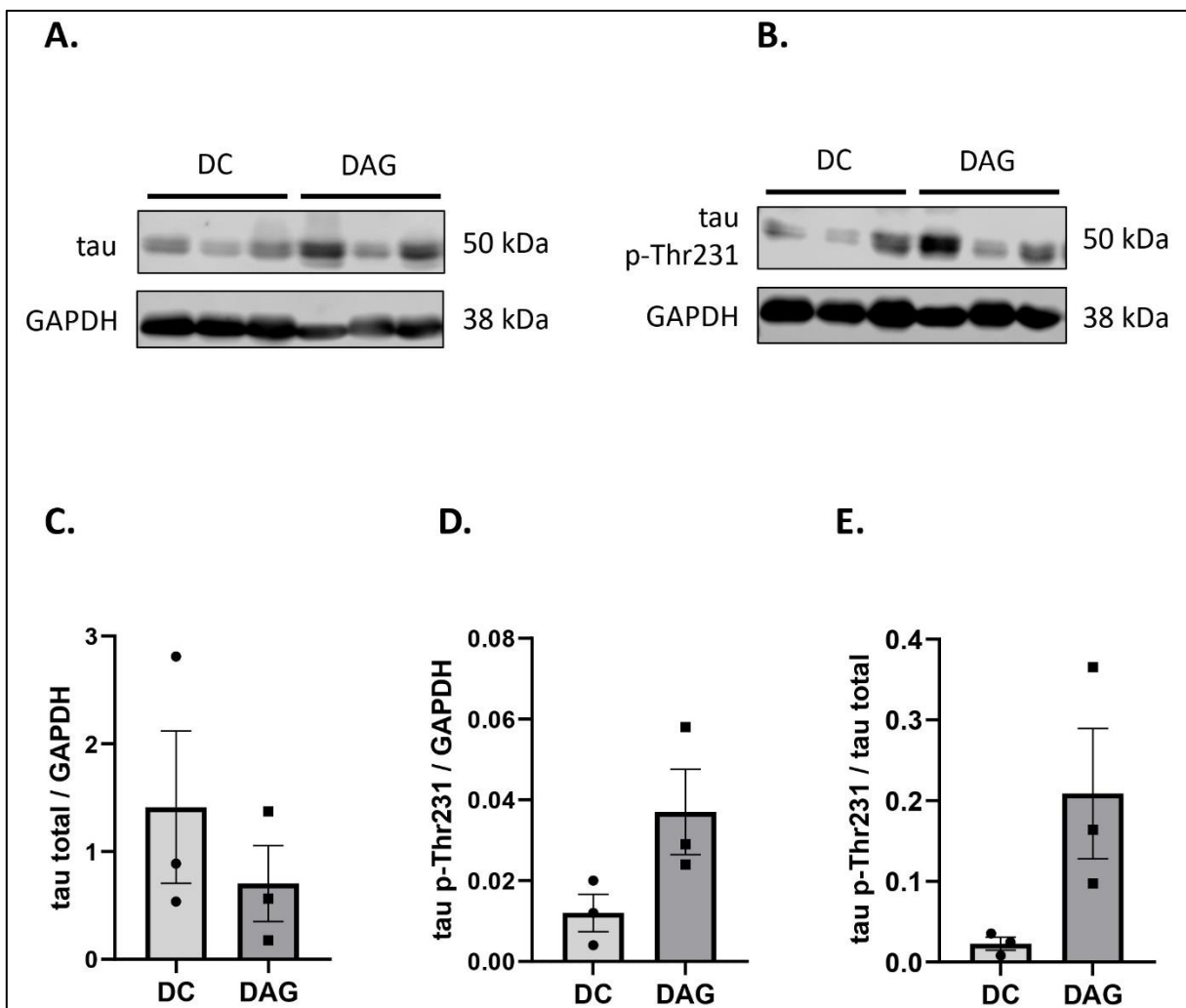
Con la finalidad de determinar el efecto de una DAG sobre la fosforilación de la proteína tau, se cuantificó, mediante WB, la proteína fosforilada en los residuos Thr205 y Thr231 y total en sobrenadantes de homogeneizados de cerebro de ratón alimentados con DC y DAG (n=3 por grupo).



**Figura 8. Detección de tau fosforilada en Thr205 mediante WB por triplicado.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (DC, carriles 1-3) y dieta alta en grasa (DAG, carriles 4-6); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular (carril 1). La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-fosfo-tau (Thr205) 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. Se detectó la banda la de tau fosforilada a aproximadamente 50 kDa y la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa.

La fig. 8 muestra los resultados obtenidos al evaluar, mediante WB, la fosforilación de tau en Thr205 y el control de carga GAPDH en las muestras de sobrenadante de homogeneizado de cerebro de ratones con DC y DAG. En la fig. 8A en el carril 4 correspondiente a DAG, se observa la banda correspondiente a tau p-Thr205 a 50 kDa (CellSignaling, 2020). Lo mismo

se observa para la B. Al ver los resultados de C se observa la banda de tau p-Thr205 en los carriles 3 y 4 correspondientes a DC y DAG, respectivamente.



**Figura 9. Cambios en tau asociados a una DAG.** (A) Imagen representativa de WB contra tau total en los grupos estudiados: dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG). (B) Imagen representativa de WB contra tau forforilada en Thr231 en los grupos estudiados. (C) Análisis densitométrico de las bandas de tau total, donde se utilizó GAPDH como control de carga. (D) Análisis densitométrico de las bandas de tau p-Thr231, donde se utilizó GAPDH como control de carga. (E) Relación tau fosforilada y tau total. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  SEM de 3 animales por grupo experimental (barras), en tanto, cada punto corresponde al promedio del triplicado del parámetro analizado en un animal en particular de su correspondiente grupo experimental ( $p < 0,05$ ; t-test).

La fig. 9 muestra las membranas ensayadas con tau total y tau fosforilada en Thr231 tras su correspondiente análisis densitométrico y estadístico, se pudo observar que no hubo cambios significativos en la cantidad de tau total (Fig. 9A y 9C) en la DAG con respecto a la DC, lo cual indica que no hay modificación en la cantidad de proteína tau presente en los sobrenadantes de homogeneizados de cerebros frente al cambio de DC por DAG. Sin embargo, se puede apreciar una tendencia no estadísticamente significativa del aumento de la expresión de tau en el grupo DAG en relación con el grupo DC (Fig. 9C).

En el caso de tau fosforilada en Thr231 (Fig. 9B y 9D) no se observó una diferencia significativa entre los grupos experimentales. La relación tau fosforilada/tau total (Fig. 9E) tampoco presentó diferencia significativa entre los triplicados de DC y DAG. No obstante, existe una tendencia no estadísticamente significativa de que la fosforilación de tau en el residuo Thr231 se ve aumentada en el grupo DAG (Fig. 9D) en comparación con el grupo DC.

En vista a los resultados se puede señalar que bajo estas condiciones experimentales la DAG no alteraría la fosforilación de tau en dicho residuo.

## 6. DISCUSIÓN

---

La ingesta excesiva de grasas, principalmente AGS, es uno de los factores de riesgo para el desarrollo de obesidad, trastornos metabólicos y demencias como la EA (Pugazhenthii et al., 2017). Los mecanismos de cómo los nutrientes y la obesidad pueden afectar el riesgo a desarrollar demencia aún no están claros, por lo que se planteó estudiar el efecto de la obesidad inducida por dietas altas en grasa sobre la fosforilación de tau en ratones C57BL/6. En este documento se presenta la evaluación de: (1) la fosforilación desactivadora de la quinasa GSK-3 $\beta$ ; y (2) la fosforilación de tau en residuos claves para la pérdida de su función biológica.

El principal hallazgo de este estudio fue la ausencia de asociación entre la obesidad y el aumento de la fosforilación de la proteína tau. El hecho de que no se encontró tal vínculo entre los grupos experimentales que no presentaron cambios significativos de sus niveles de fosforilación, plantea la posibilidad de que una correlación entre obesidad y fosforilación de tau no implica causalidad. Aunque, no se puede descartar que lo observado se deba a deficiencias en el diseño experimental o a un tamaño insuficiente de la muestra ( $n = 3$ ) que incapacite a las pruebas estadísticas de encontrar diferencias que realmente existen (Faber y Fonseca, 2014).

En el caso particular de GSK-3 $\beta$ , no se pudo establecer si su fosforilación en Ser9 ocurría y menos si esta variaba, ya que, en todos los WB realizados las membranas no mostraron señal quimioluminiscente (Fig. 6), imposibilitando análisis densitométricos y estadísticos. Para descartar algún defecto, producto de una transferencia incorrecta de proteínas desde el gel de poliacrilamida hacia la membrana de nitrocelulosa, se realizaron tinciones de rojo Ponceau luego de cada transferencia (Fig. 5). Además, se realizaron modificaciones del protocolo de WB con la misma finalidad. Primero, se decidió aumentar la cantidad de proteína cargada en cada bolsillo del gel de 30 ug a 50 ug. Luego se optó por cambiar la solución de bloqueo de leche descremada al 5% en TBS-T por BSA en TBS-T a la misma concentración, para así descartar que posibles interacciones de la leche descremada con las proteínas fosforiladas fuera la causa de la imperceptible captación de la señal (Bass et al., 2017; Sharma y Carew, 2002). Asimismo, se cambió la dilución de anticuerpo primario de 1:1500 a 1:1000 y, finalmente, se decidió por ensayar distintos tiempos de exposición: 2, 6 y 12 minutos. Sin embargo, ninguno de los cambios realizados consiguió la aparición de señal quimioluminiscente (Fig. 6). Por consiguiente, la falta de señal en las membranas podría explicarse por tres



razones: (1) la proteína fosforilada no se encuentra en la muestra, (2) los inhibidores de fosfatasa empleados fueron insuficientes, o (3) el anticuerpo primario perdió actividad (Bass et al., 2017; Mahmood y Yang, 2012).

La falta de señal de GSK-3 $\beta$  fosforilada en Ser9 (Fig. 6) se contrapone a los estudios de Bhat y Thirumangalakudi, 2013, que constataron una disminución en la fosforilación inactivadora de GSK-3 $\beta$  (en Ser9) y un aumento en la fosforilación activadora de GSK-3 $\alpha/\beta$  (en Tyr279/Tyr216), lo cual indica la presencia de la forma activa de GSK-3 $\beta$  en el hipocampo de ratones C57BL/6 alimentados con DAG y colesterol durante 2 meses. A su vez, Kothari et al., 2017, en cerebros de ratón C57BL/6NHsd de seis semanas de edad alimentados con dieta normal y DAG con azúcar por 14 semanas, evidenciaron que cambios en la sensibilidad a la insulina activan vías que contribuyen al deterioro cognitivo. Al respecto, se observó que la DAG con azúcar contribuyó a una mayor expresión de la forma activa de GSK-3 $\beta$ . Con base en los anteriores estudios, se puede excluir la idea de que la población de la GSK-3 $\beta$  total detectada (Fig. 7) no se presentase en absoluto fosforilación en Ser9. Es decir, se descarta que el total de la población de la quinasa se encuentra activa y fosforilando tau, quedando la posibilidad que la ausencia de señal quimioluminiscente (Fig. 6) se debiese a problemas con los inhibidores de fosfatasa o el anticuerpo primario empleado.

Un tampón de lisis ideal debería garantizar que las modificaciones postraduccionales de una muestra permanezcan y es por ello que debe contener inhibidores de fosfatasa como ortovanadato de sodio, fluoruro de sodio y  $\beta$ -glicerofosfato además de un cóctel de inhibidores de proteasa (Kaufmann et al., 2001). El tampón de lisis, RIPA, utilizado en estos experimentos fue preparado agregando un cóctel de inhibidores de fosfatasa que contenía fluoruro de sodio (inhibidor de fosfatasa de serina y treonina), ortovanadato de sodio (inhibidor de fosfatasa de tirosina), pirofosfato de sodio (inhibidor de fosfatasa de serina y treonina) y  $\beta$ -glicerofosfato (inhibidor de fosfatasa de serina y treonina). Este fue empleado según las recomendaciones estándar del fabricante, es decir, una tableta por 10 ml de solución 1 X. Sin embargo, el mismo fabricante señala que las muestras que contienen niveles particularmente altos de actividad de fosfatasa pueden requerir una concentración final de 2-3 X (ThermoFisher, 2016). En este sentido, es probable que las muestras de cerebro ensayadas presentasen una actividad de fosfatasa tal que necesitasen una mayor concentración del cóctel inhibitorio y, por consiguiente, esto podría ser la causa de falta de señal de las proteínas fosforiladas estudiadas.

También es conveniente considerar el hecho que los anticuerpos fosforilados contenían como preservante azida de sodio entre 0.02% y 0.05% que, si bien para la mayoría de las aplicaciones esto no es problemático, hay excepciones en que este compuesto puede interferir con los anticuerpos conjugados con HRP y/o la conjugación de anticuerpos (Bass et al., 2017; Mahmood y Yang, 2012). En estos casos es conveniente realizar la remoción de dicho compuesto mediante diálisis, desalinización o kit de purificación de anticuerpos (Abcam, 2023).

Las anteriores explicaciones se pueden extender para explicar lo sucedido con los problemas de señal quimioluminiscente que presentaron las membranas sondaadas con tau fosforilada en el residuo Thr205 (Fig. 8).

Por su parte, tau total (Fig. 9A) y tau fosforilada en Thr231 (Fig. 9B) sí pudieron ser detectadas y posteriormente analizadas. Los resultados obtenidos indicaron que, en las condiciones estudiadas no hay cambios significativos de tau ( $P = 0,7$ ), tau p-Thr231 ( $P = 0,1$ ) y p-tau/tau ( $P = 0,1$ ) entre ambos grupos experimentales (Fig. 9C, 9D y 9E), indicando que el cambio de una DC a una DAG bajo las condiciones ensayadas (ver 4.2.1 y 4.2.2) no altera la fosforilación de tau en Thr231 en los sobrenadantes de homogeneizados de cerebro. No obstante, se observa una tendencia estadísticamente no significativa del aumento de tau (Fig. 9C) y tau p-Thr231 (Fig. 9D) en el grupo DAG.

Las tendencias observadas en tau se condicen con los estudios de Bhat y Thirumangalakudi, 2013, que mediante WB analizaron tau fosforilada en Ser396/Ser404 y Thr231 en el hipocampo de ratones, observando un aumento de la fosforilación de tau y una correlación entre la fosforilación de tau y la activación de GSK-3 $\beta$ , en respuesta a una DAG y colesterol en comparación con los ratones tratados con DC. Más recientemente Nakandakari et al., 2019, estudiaron ratones C57BL/6J de 4 semanas de edad alimentados por 3, 7 y 10 días con una DAG a los que se les extrajo el hipocampo para analizar la fosforilación de tau en los residuos Ser202 y Ser726, entre otros parámetros. Los investigadores notaron que la fosforilación de tau aumentó después de 3 y 10 días, mientras que el contenido de tau total aumentó después de 3 días. De igual modo, se evidenció que a los 10 días de ingerir una dieta rica en grasas saturadas ocurre la activación de señales inflamatorias, apoptóticas y de estrés del retículo endoplasmático.

Petrov et al., 2015, evaluaron los efectos de una DAG en la memoria dependiente del hipocampo en ratones C57BL/6 y APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> (modelo bien establecido de EA familiar), comprobando que 5 meses de exposición a dicha dieta, posterior al destete, es suficiente para producir déficits de memoria dependientes del hipocampo e independientes de  $\beta$ -amiloide, síndrome metabólico y reducción del metabolismo de OXPHOS en los roedores a una edad relativamente joven. Al contrario, Gratuze et al., 2016, utilizando ratones hTau (modelo animal más exacto de la patología tau humana en la EA) de dos meses de edad para evaluar el efecto de DAG, altas en colesterol y/o altas en azúcar sobre la fosforilación de tau en hipocampo y corteza cerebral, no encontraron efectos significativos en ninguno de los grupos experimentales tras 6 meses de exposición a sus correspondientes dietas.

La revisión bibliográfica permite vislumbrar que las apreciaciones en apariencia controversiales varían dependiendo la metodología aplicada, es decir: modelo animal, tipo de dieta, edad a la que se comienza a administrar la dieta, tiempo de exposición a la dieta y área o sección cerebral que se desea analizar. Estas variantes brindan un punto de partida para analizar qué mejoras se pudieran aplicar o incorporar a los procedimientos realizados en el presente estudio.

Con el propósito de disponer mejoras lo primero es establecer cuáles fueron las limitaciones que surgieron durante el trabajo. Estas residen primera y principalmente en el conjunto de muestras relativamente pequeño utilizado, con el cual, si bien no se pudo observar diferencias significativas entre los grupos, si permitió percibir ciertas tendencias al alza de tau total (Fig. 9C) y tau fosforilada en Thr231 (Fig. 9D) en el grupo DAG con relación al DC. Además, se debe ponderar el impacto de utilizar homogeneizados de cerebro completo en la dilución de las proteínas presentes en la muestra, lo cual pudo causar la falta de captación de señal de ciertas proteínas fosforiladas (Fig. 6 y 8), considerando que las áreas del cerebro relacionadas con la memoria que se ven primera y mayoritariamente afectadas corresponden al hipocampo y/o córtex (Petrov et al., 2015). Por último, y relacionado con lo anterior, el tiempo de exposición a la dieta pudo ser insuficiente para impedir que respuestas compensatorias del organismo enmascarasen los cambios que se esperaban observar a nivel de cerebro completo.

Acorde a lo expuesto y partiendo por establecer que se mantiene el modelo animal (C57BL/6), a futuro, es esencial aumentar el n muestral a 4–6 por grupo experimental (Bhat y

Thirumangalakudi, 2013; Kothari et al., 2017; Nakandakari et al., 2019; Petrov et al., 2015), con tal de incrementar la probabilidad de observar diferencias significativas entre grupos. Asimismo, es indispensable reducir la sección cerebral de interés al hipocampo y/o córtex (Bhat y Thirumangalakudi, 2013; Gratuze et al., 2016; Nakandakari et al., 2019; Petrov et al., 2015) en lugar del cerebro completo (Kothari et al., 2017), tanto para evitar una posible dilución de las proteínas presentes en la muestra como también para observar más específicamente los cambios tempranos en la fosforilación de tau, por lo cual es menester restringir el estudio a las primeras áreas en verse afectadas.

En cuanto a la DAG, si la fuente principal de grasa (aceite de coco) se mantiene invariable, es conveniente administrar la dieta a partir del primer mes de vida y ampliar el tiempo exposición a dicha alimentación a 20 semanas (Petrov et al., 2015). En el caso de considerar cambiar la fuente principal de grasa a una de origen animal (ej. manteca de cerdo, leche anhidra) se puede considerar disminuir el periodo de exposición a la DAG a 8 semanas (Bhat y Thirumangalakudi, 2013) o incluso días (Nakandakari et al., 2019). Sin embargo, estas recomendaciones son exclusivas para estudios en hipocampo, por lo que, para análisis en cerebro completo se deben tener en cuenta otras modificaciones como administrar la DAG con azúcar añadida por 14 semanas (Kothari et al., 2017) para así potenciar la activación de señales inflamatorias a nivel sistémico y cerebral producto de la obesidad, evitando así la influencia de probables mecanismos compensatorios.

Adicionalmente, se ha de tener presente aumentar la concentración de inhibidores en el tampón de lisis (ThermoFisher, 2016) para evitar la pérdida de las fosforilaciones presentes en la muestra *in vivo*.

El presente estudio permitió evaluar y establecer un protocolo de medición de GSK-3 $\beta$ , tau y tau fosforilada en Thr231 en homogeneizados de cerebro de ratón, ofreciendo una visión general de qué sucede con los niveles de estas en las condiciones ensayadas y la posibilidad de ser útil para otras quinasas (ej. Cdk5) y fosforilaciones de tau en tejido cerebral.

## 7. CONCLUSIONES

---

La cantidad insuficiente de datos recabados de las proteínas fosforiladas, GSK-3 $\beta$  p-Ser9 y tau Thr205, imposibilita concluir que una DAG promueve la desfosforilación activadora de la quinasa GSK-3 $\beta$  y el consecuente aumento de los niveles fosforilación de la proteína tau en los residuos Thr205 y Thr231 en el cerebro de ratones obesos. En consecuencia y con base en los resultados obtenidos la hipótesis no se cumple. Sin embargo, se logró observar una tendencia estadísticamente no significativa del aumento de tau total y tau fosforilada en el residuo Thr231 en el caso de la DAG en comparación con la DC, por lo cual, para futuros estudios es primordial aumentar el n muestral por grupo.

## 8. REFERENCIAS

---

- Abcam. (2023). *Sodium azide remove protocol*. <https://docs.abcam.com/pdf/antibody-guide/sodium-azide-removal-protocol.pdf>
- Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., y Mantzoros, C. S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: Weighing the evidence. *Obesity Reviews*, 19(2), 269–280. <https://doi.org/10.1111/obr.12629>
- Alzheimer's Association. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Astrup, A., Dyerberg, J., Selleck, M., y Stender, S. (2008). Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obesity reviews*, 9, 48–52. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00438.x>
- Avtanski, D., Pavlov, V. A., Tracey, K. J., y Poretsky, L. (2019). Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Models and Experimental Medicine*, 2(4), 252–258. <https://doi.org/10.1002/ame2.12084>
- Barazzoni, R., Gortan Cappellari, G., Ragni, M., y Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders*, 23(2), 149-157. <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6>
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., y Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4–25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
- Bhat, N. R., y Thirumangalakudi, L. (2013). Increased tau phosphorylation and impaired brain insulin/IGF signaling in mice fed a high fat/high cholesterol diet. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(4), 781–789. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121030>
- CellSignaling. (2020). *Data Sheet: Phospho-Tau (Thr205) (E7D3E) rabbit mAb #49561*.

- Chatterjee, S., Ambegaokar, S. S., Jackson, G. R., y Mudher, A. (2019). Insulin-mediated changes in tau hyperphosphorylation and autophagy in a *Drosophila* model of tauopathy and neuroblastoma cells. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 801. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00801>
- Cook, C. N., Murray, M. E., y Petrucelli, L. (2015). Understanding biomarkers of neurodegeneration: Novel approaches to detecting tau pathology. *Nature Medicine*, 21(3), 219–220. <https://doi.org/10.1038/nm.3809>
- de Salud Pública, S. (2017). *Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Primeros resultados*. [https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17\\_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf](https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf)
- Devos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., y Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*, 9(374), eaag0481. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0481>
- Duarte, L., Quezada, J., Ramirez, L. A., Vasquez, K., Orellana, J. F., Villanueva, V., Perez-Bravo, F., y Garcia-Diaz, D. F. (2021). The treatment with an extract from Calafate (*Berberis microphylla*) induces transcript and protein expression of molecules involved in thermogenesis and adipocyte browning in adipose tissue from obese mice. *Journal of Berry Research*, 11(2), 267–277. <https://doi.org/10.3233/jbr-200670>
- Faber, J., y Fonseca, L. M. (2014). How sample size influences research outcomes. *Dental Press J Orthodontics*. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.4.027-029.ebo>
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Nido, J., Smith, M. A., Perry, G., y Avila, J. S. (2002). Effect of the Lipid Peroxidation Product Acrolein on Tau Phosphorylation in Neural Cells. *Journal of Neuroscience Research*, 71(6), 863-870. <https://doi.org/10.1002/jnr.10525>
- Gonçalves, R. A., Wijesekara, N., Fraser, P. E., y De Felice, F. G. (2019). The link between tau and insulin signaling: Implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00017>

- Gratuze, M., Julien, J., Morin, F., Calon, F., Hébert, S. S., Marette, A., y Planel, E. (2016). High-fat, high-sugar, and high-cholesterol consumption does not impact tau pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of Aging*, 47, 71–73. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.016>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartroft, W. S. (1960). The Pathology of Obesity. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 36(5), 313–322.
- Hewlett, E. (2019). *Estudios de la OCDE sobre Salud Pública Chile: Hacia un futuro más sano*. <https://www.oecd.org/health/health-systems/Revisión-OCDE-de-Salud-Pública-Chile-Evaluación-y-recomendaciones.pdf>
- Hole, K. L., y Williams, R. J. (2020). Flavonoids as an intervention for Alzheimer's disease: Progress and hurdles towards defining a mechanism of Action. *Brain Plasticity*, 6(2), 167–192. <https://doi.org/10.3233/bpl-200098>
- Iqbal, K., Liu, F., y Gong, C. X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: The story so far. *Nature Reviews Neurology*, 12(1), 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.225>
- Jaacks, L. M., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C. J., Wallace, C., Imamura, F., Mozaffarian, D., Swinburn, B., y Ezzati, M. (2019). The obesity transition: Stages of the global epidemic. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7(3), 231–240. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30026-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30026-9)
- Kaufmann, H., Bailey, J. E., y Fussenegger, M. (2001). Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *PROTEOMICS: International Edition*, 1(2), 194–199. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200102\)1:2<194::AID-PROT194>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200102)1:2<194::AID-PROT194>3.0.CO;2-K)
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Del Alonso, C. A., Iqbal, K., y Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24374–24384. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)80536-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)80536-5)



- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O'Neill, A. M., Greene, M. W., Geetha, T., y Babu, J. R. (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.006>
- Krisanits, B., Randise, J. F., Burton, C. E., Findlay, V. J., y Turner, D. P. (2020). Pubertal mammary development as a “susceptibility window” for breast cancer disparity. *Advances in Cancer Research*, 9(1), 146, 57–82. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.01.004>
- Krstic, D., y Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 9(1), 25–34. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.236>
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.-K., y Yen, S.-H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Research*, 597(2), 209–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91476-u](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91476-u)
- Laitinen, M. H., Ngandu, T., Rovio, S., Helkala, E. L., Uusitalo, U., Viitanen, M., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., y Kivipelto, M. (2006). Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: A population-based study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 22(1), 99–107. <https://doi.org/10.1159/000093478>
- Lauretti, E., Dincer, O., y Praticò, D. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1867(5), 118664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118664>
- Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F. J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., Bantubungi, K., Breton, C., Pigny, P., Buée-Scherrer, V., Staels, B., Hamdane, M., Tailleux, A., Bueé, L., y Blum, D. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on  $\tau$  pathology are independent of insulin resistance in  $\tau$  transgenic mice. *Diabetes*, 62(5), 1681–1688. <https://doi.org/10.2337/db12-0866>
- Lee, G., y Leugers, C. J. (2012). Tau and tauopathies. *Progress in Molecular Biology and*

*Translational Science*, 107, 263–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00004-7>

Liu, F., Liang, Z., y Gong, C. X. (2006). Hyperphosphorylation of tau and protein phosphatases in Alzheimer disease. *Panminerva Medica*, 48(2), 97–108.

Liu, Q., Smith, M. A., Avilá, J., DeBernardis, J., Kansal, M., Takeda, A., Zhu, X., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P. I., Oliveira, C. R., Santos, M. S., Shimohama, S., Aliev, G., De La Torre, J., Ghanbari, H. A., Siedlak, S. L., Harris, P. L. R., Sayre, L. M., y Perry, G. (2005). Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(6), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.005>

Mahmood, T., y Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Mattson, M. P., Fu, W., Waeg, G., y Uchida, K. (1997). 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport*, 8(9), 2275–2281. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707070-00036>

Muñoz-Montaño, J. R., Moreno, F. J., Ávila, J., y Díaz-Nido, J. (1997). Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Letters*, 411(2–3), 183–188. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00688-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00688-1)

Nakandakari, S. C. B. R., Muñoz, V. R., Kuga, G. K., Gaspar, R. C., Sant'Ana, M. R., Pavan, I. C. B., da Silva, L. G. S., Morelli, A. P., Simabuco, F. M., da Silva, A. S. R., de Moura, L. P., Ropelle, E. R., Cintra, D. E., y Pauli, J. R. (2019). Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.016>

Okereke, O. I., Rosner, B. A., Kim, D. H., Kang, J. H., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., Willett, W. C., y Grodstein, F. (2012). Dietary fat types and 4-year cognitive change in community-dwelling older women. *Annals of Neurology*, 72(1), 124–134.

<https://doi.org/10.1002/ana.23593>

- Orr, M. E., Sullivan, A. C., y Frost, B. (2017). A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.011>
- Patil, S., y Chan, C. (2005). Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 384(3), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.05.003>
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vazquez-Carrera, M., Folch, J., y Camins, A. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1687–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.004>
- Picone, P., Di Carlo, M., y Nuzzo, D. (2020). Obesity and Alzheimer's disease: Molecular bases. *European Journal of Neuroscience*, 52(8), 3944–3950. <https://doi.org/10.1111/ejn.14758>
- Popkin, B. M., Adair, L. S., y Ng, S. W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 70(1), 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>
- Prince, M. J., Wimo, A., Guerchet, M. M., Ali, G. C., Wu, Y. T., y Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost, and trends*. Alzheimer's Disease International.
- Pugazhenthí, S., Qin, L., y Reddy, P. H. (2017). Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>
- ResearchDiets. (2006a). *Product Data - D12328*.
- ResearchDiets. (2006b). *Product Data - D12330*.

- Rodriguez-Rodriguez, P., Sandebring-Matton, A., Merino-Serrais, P., Parrado-Fernandez, C., Rabano, A., Winblad, B., Ávila, J., Ferrer, I., y Cedazo-Minguez, A. (2017). Tau hyperphosphorylation induces oligomeric insulin accumulation and insulin resistance in neurons. *Brain*, 140(12), 3269–3285. <https://doi.org/10.1093/brain/awx256>
- Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Hwalla, N., Hursting, S. D., Leitzmann, M., Margetts, B., Nishida, C., Potischman, N., Seidell, J., Stepien, M., Wang, Y., Westerterp, K., Winichagoon, P., Wiseman, M., y Willett, W. C. (2017). Energy balance and obesity: what are the main drivers?. *Cancer Causes & Control*, 28(3), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0869-z>
- Sharma, S. K., y Carew, T. J. (2002). Inclusion of phosphatase inhibitors during Western blotting enhances signal detection with phospho-specific antibodies. *Analytical Biochemistry*, 307(1), 187-189. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00008-8)
- Špolcová, A., Mikulášková, B., Kršková, K., Gajdošechová, L., Zórad, Š., Olszanecki, R., Maciej, S., Bujak-Giżycka, B., Železná, B., y Maletínská, L. (2014). Deficient hippocampal insulin signaling and augmented Tau phosphorylation is related to obesity- and age-induced peripheral insulin resistance: A study in Zucker rats. *BMC Neuroscience*, 15, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-111>
- Terzo, S., Amato, A., y Mulè, F. (2021). From obesity to Alzheimer’s disease through insulin resistance. *Journal of Diabetes and its Complications*, 35(11), 108026. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.108026>
- ThermoFisher. (2016). *Product Information Sheet: Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets*.
- Whitmer, R. A., Gustafson, D. R., Barrett-Connor, E., Haan, M. N., Gunderson, E. P., y Yaffe, K. (2008). Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology*, 71(14), 1057–1064. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000306313.89165.ef>
- WHO. (2021). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xiong, J., Deng, I., Kelliny, S., Lin, L., Bobrovskaya, L., y Zhou, X. F. (2022). Long term high fat diet induces metabolic disorders and aggravates behavioral disorders and cognitive

deficits in MAPT P301L transgenic mice. *Metabolic Brain Disease*, 37(6), 1941–1957. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01029-x>

Xu, W. L., Atti, A. R., Gatz, M., Pedersen, N. L., Johansson, B., y Fratiglioni, L. (2011). Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. *Neurology*, 76(18), 1568-1574. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182190d09>

Zhang, Y., Huang, N. qu, Yan, F., Jin, H., Zhou, S. yu, Shi, J. shan, y Jin, F. (2018). Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 $\beta$  as a potential link. *Behavioural Brain Research*, 339, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.015>

Zhang, Y., Wu, K. M., Yang, L., Dong, Q., y Yu, J. T. (2022). Tauopathies: New perspectives and challenges. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00533-z>

Zhu, X., Rottkamp, C. A., Boux, H., Takeda, A., Perry, G., y Smith, M. A. (2000). Activation of p38 Kinase Links Tau Phosphorylation, Oxidative Stress, and Cell Cycle-Related Events in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(10), 880–888. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.10.880>

Zhuang, Q. S., Meng, L., Wang, Z., Shen, L., y Ji, H. F. (2021). Associations between obesity and Alzheimer's disease: Multiple bioinformatic analyses. *Journal of Alzheimer's Disease*, 80(1), 271–281. <https://doi.org/10.3233/JAD-201235>

## ANEXO 1

---



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN

Este Comité certifica que las modificaciones solicitadas por el **Dr. Diego Garcia** al Protocolo **CBA # 0944 FMUCH** han sido aprobadas, las cuales consisten en la cesión de muestras previamente aisladas a experimentos del proyecto de Investigación en Salud de la Facultad de Medicina “Efecto de la obesidad inducida por una dieta alta en grasa sobre la expresión de marcadores de neurodegeneración en ratones C57BL/6J” cuya IP es la Dra. María Elsa Pando, del Departamento de Nutrición. Dicho proyecto utilizará cerebros ya aislados de los ratones utilizados en el protocolo CBA # 0944 , por lo que no se agrega ninguna intervención a este.

Estas modificaciones no alteran ni contravienen las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales previamente aprobados (Protocolo CBA # 0944 FMUCH).



**Dr. César Romero Barraeto**  
Secretario

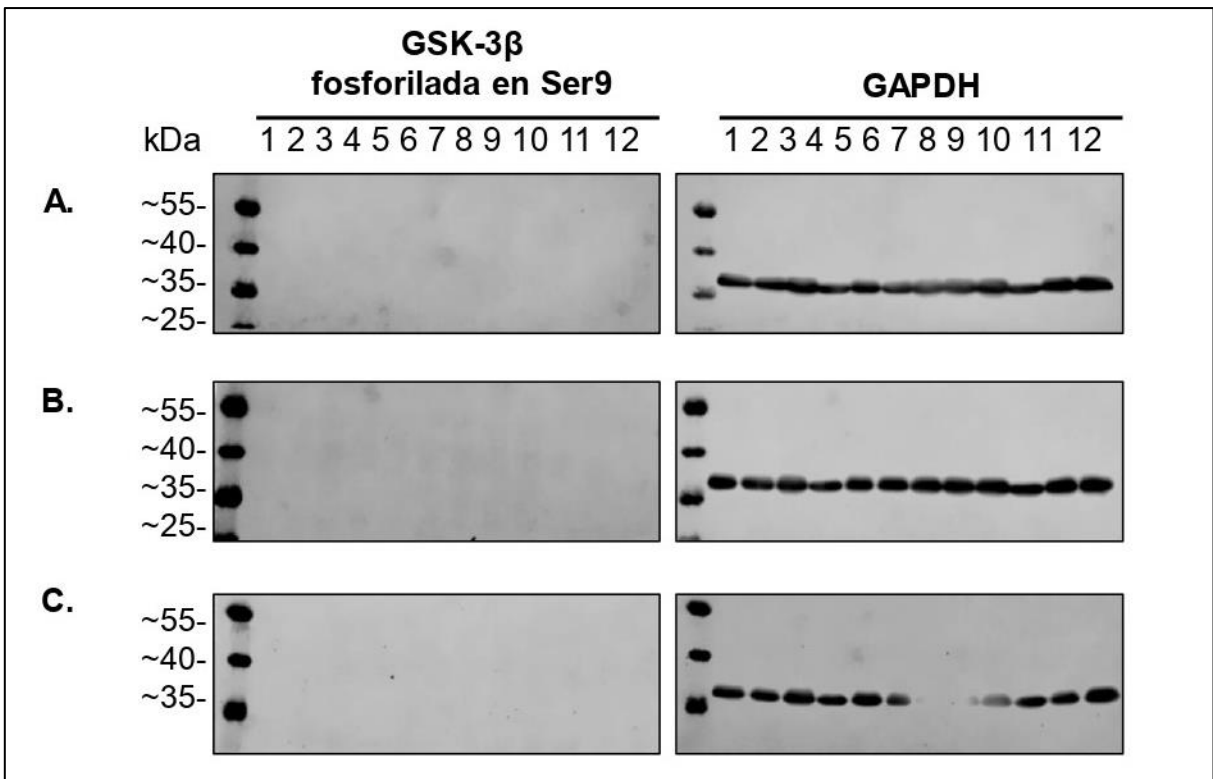
*Comité de Bioética sobre Investigación en Animales*

Santiago, 7 de junio de 2019

---

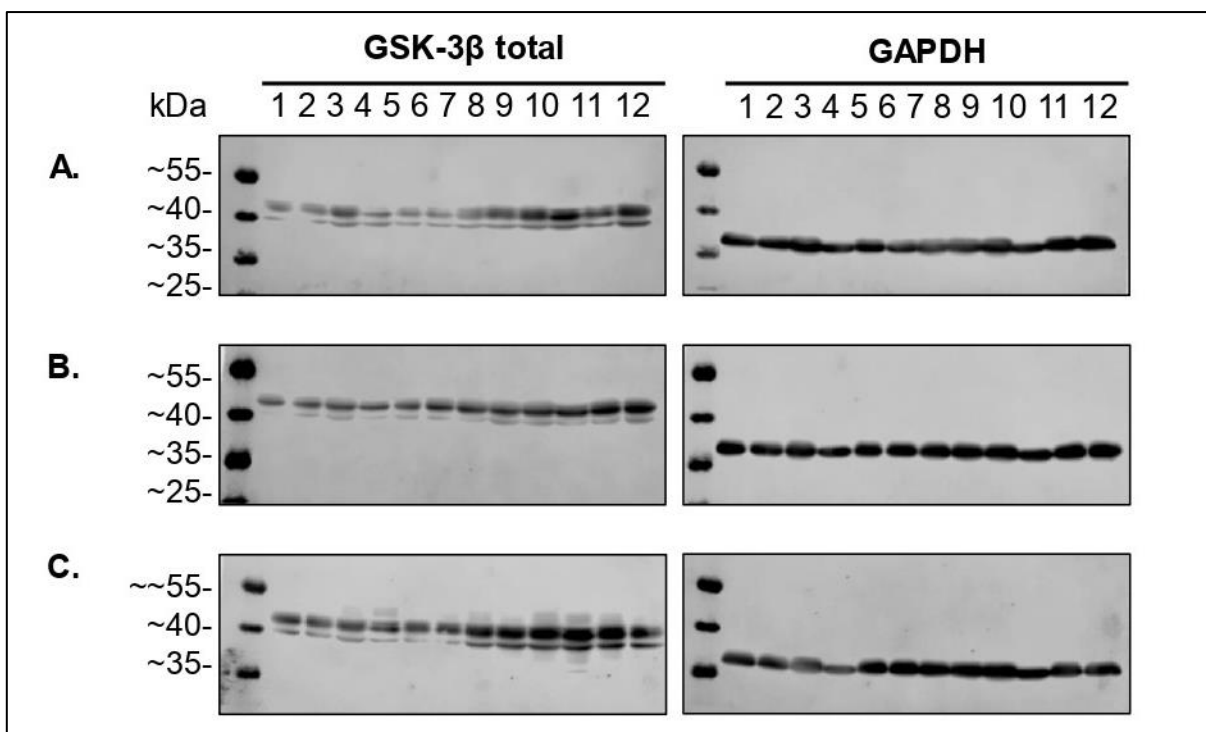
Comité de Bioética sobre Investigación en Animales  
Facultad de Medicina – Universidad de Chile  
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile  
Fono: 2 978 6923, Email: [cba@med.uchile.cl](mailto:cba@med.uchile.cl)

## ANEXO 2



**Datos sin procesar utilizados para calcular la expresión de GSK-3β p-Ser9.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (carriles 1-3), alta en grasa (carriles 4-6) y otras (carriles 7-12); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-fosfo-GSK-3β (Ser9) 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. En los triplicados se detectó la banda la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa, pero no la de GSK-3β fosforilada.

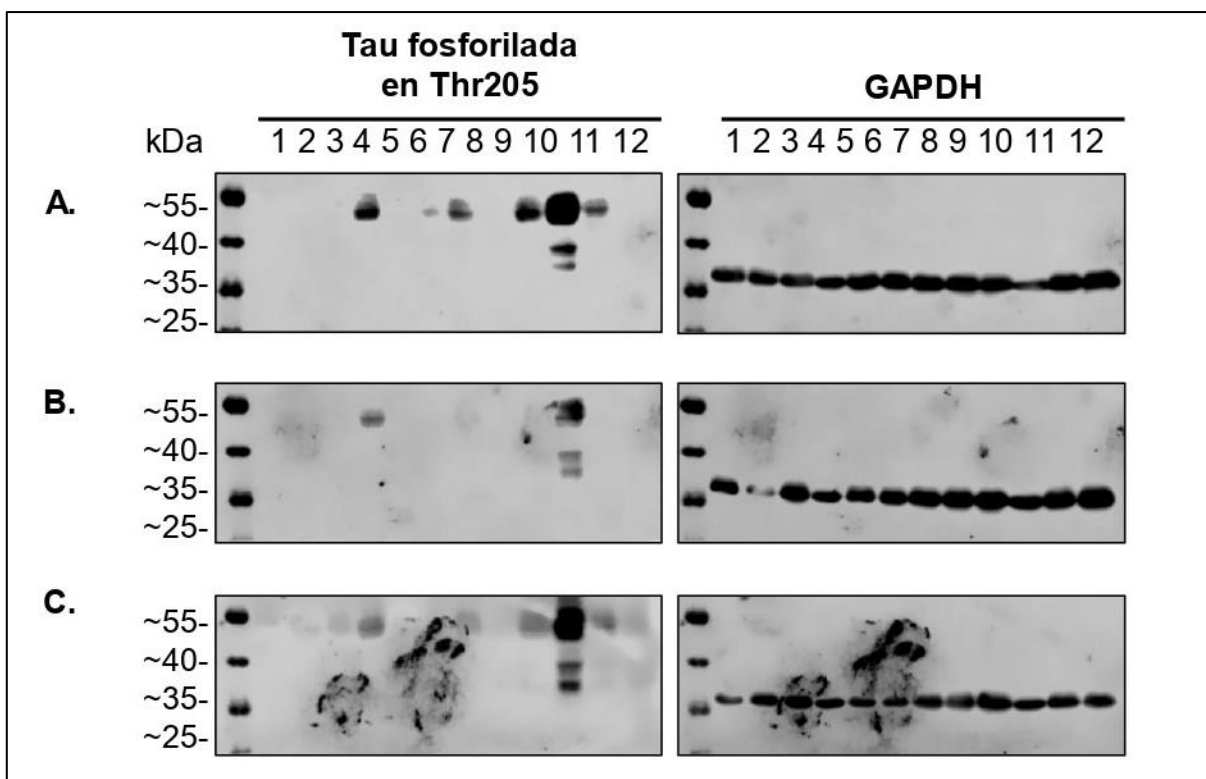
## ANEXO 3



**Datos sin procesar utilizados para calcular la expresión de GSK-3 $\beta$  total.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (carriles 1-3), alta en grasa (carriles 4-6) y otras (carriles 7-12); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-GSK-3 $\beta$  1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. Se detectó la banda de GSK-3 $\beta$  a aproximadamente 46 kDa y la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa.

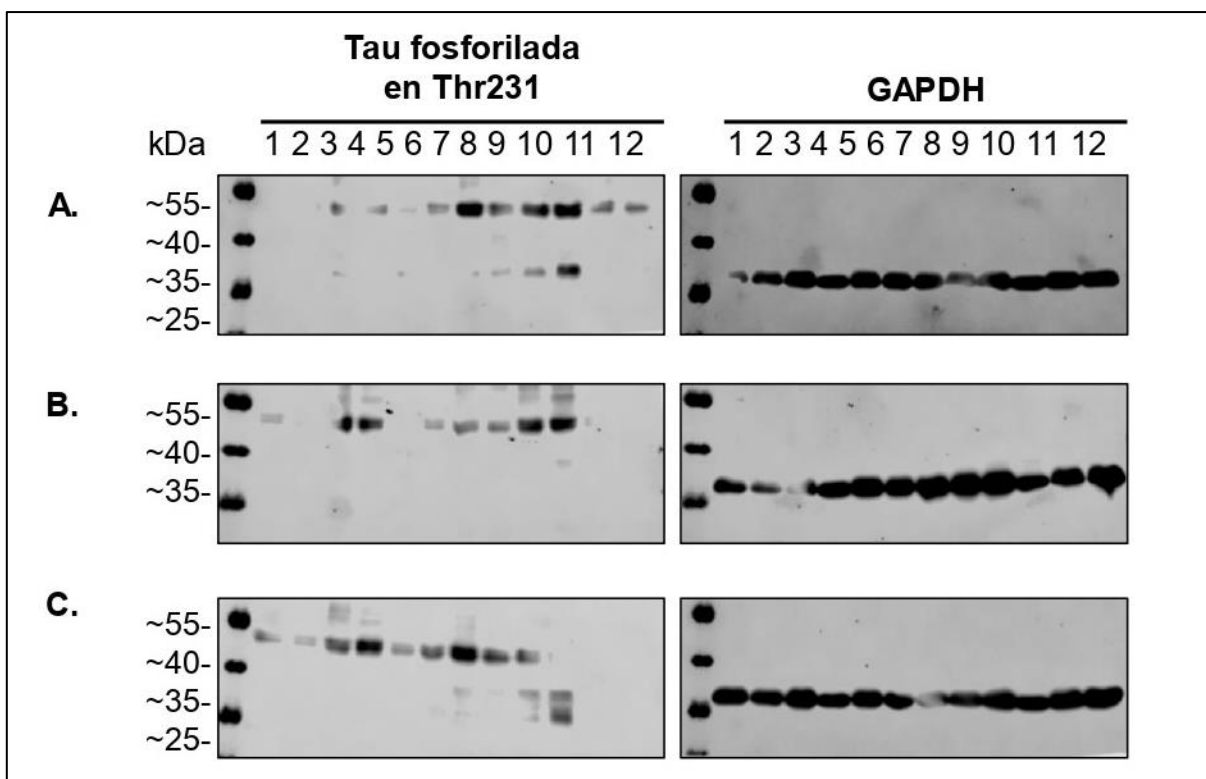


## ANEXO 4



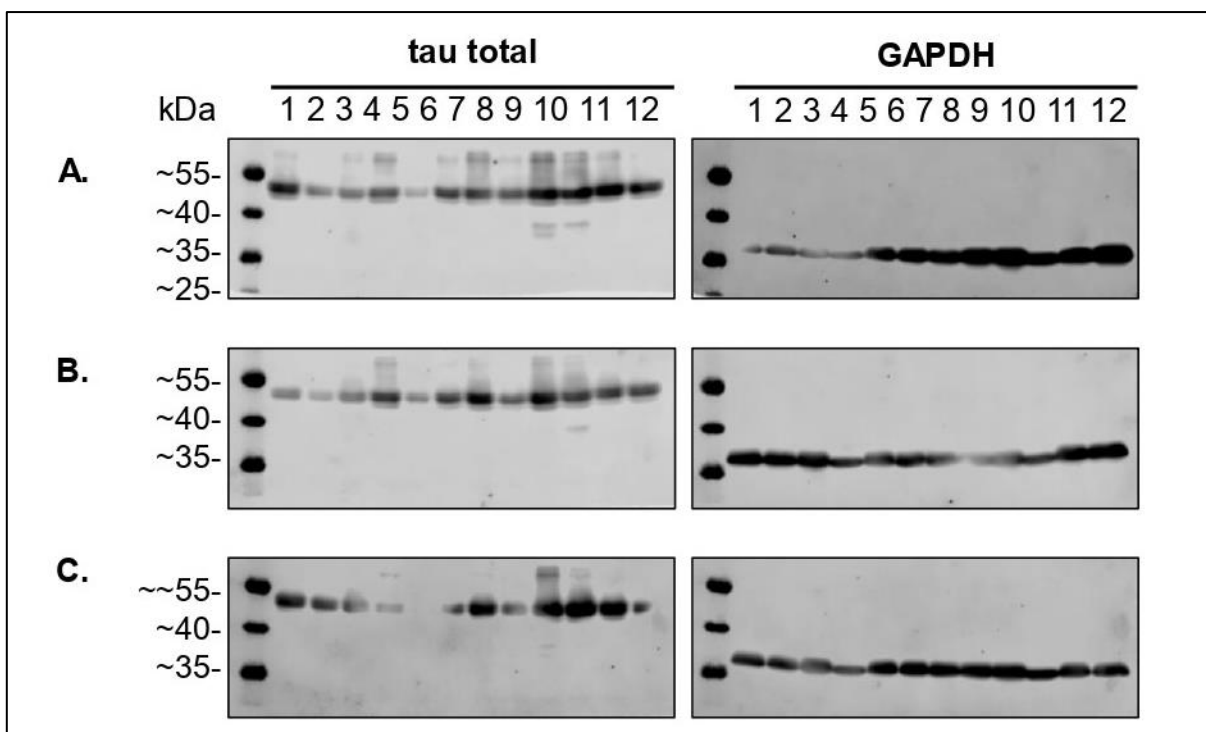
**Datos sin procesar utilizados para calcular la expresión de tau p-Thr205.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (carriles 1-3), alta en grasa (carriles 4-6) y otras (carriles 7-12); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-fosfo-tau (Thr205) 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. Se detectó la banda la de tau fosforilada a aproximadamente 50 kDa y la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa.

## ANEXO 5



**Datos sin procesar utilizados para calcular la expresión de tau p-Thr231.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (carriles 1-3), alta en grasa (carriles 4-6) y otras (carriles 7-12); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpo primario anti-fosfo-tau (Thr231) 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. Se detectó la banda la de tau fosforilada a aproximadamente 50 kDa y la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa.

## ANEXO 6



**Datos sin procesar utilizados para calcular la expresión de tau total.** (A) replica 1, (B) replica 2 y (C) replica 3 de WB de homogeneizados de cerebros de ratón alimentados con dieta control (carriles 1-3), alta en grasa (carriles 4-6) y otras (carriles 7-12); empleando PageRuler™ (#26616) como estándar de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se sondeó con anticuerpo primario anti-tau 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-conejo 1:50.000. Para el control de carga se utilizó anticuerpo primario anti-GAPDH 1:1000 seguido de anticuerpo secundario anti-cabra 1:50.000. Se detectó la banda la de tau a aproximadamente 50 kDa y la de GAPDH a aproximadamente 38 kDa.