

**Análisis proteómico de la respuesta protectora mediada por el esteroide sintético
Tibolona frente a un insulto lipotóxico en astrocitos humanos.**

Diego Julián Vesga Jiménez

TESIS

**Presentado como requisito parcial para optar por el título de
Magister en ciencias biológicas**

DIRECTORA

Janneth Gonzalez Santos M.Sc., PhD.

CO-DIRECTOR

Andrés Felipe Aristizábal Pachón

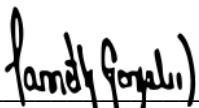


**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BIOQUÍMICA
BOGOTÁ, D.C. 14/01/2021**

**Análisis proteómico de la respuesta protectora mediada por el esteroide sintético Tibolona
frente a un insulto lipotóxico en astrocitos humanos.**

Diego Julián Vesga Jiménez, BSc

Supervisores de tesis

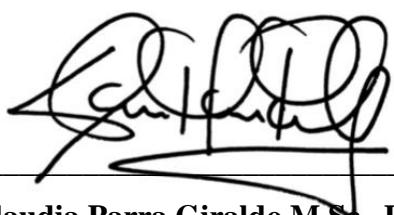


Janneth Gonzalez Santos M.Sc., PhD.
Director de Trabajo de Grado



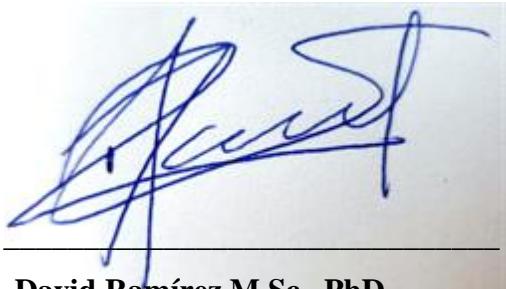
Andrés Felipe Aristizábal M.Sc., PhD
Co-director

Jurados



Claudia Parra Giraldo M.Sc., PhD.

Jurado 1



David Ramírez M.Sc., PhD

Jurado 2



Monica Patricia Cala Molina M.Sc., PhD.

Jurado 3

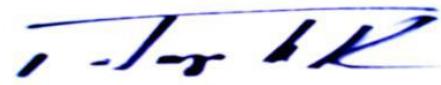
**Análisis proteómico de la respuesta protectora mediada por el esteroide sintético Tibolona
frente a un insulto lipotóxico en astrocitos humanos.**

Diego Julián Vesga Jiménez, BSc

APROBADO



Concepción Judith Puerta Bula PhD.
Decana Académica Facultad de Ciencias



Alba Alicia Trespalacios PhD.
Directora de posgrados facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

A mi madre, mí amparo y soporte

A mi padre por su apoyo

A todos los que llamo familia

Per aspera ad astra

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo cierro la etapa de formación más relevante y desafiante que he tenido en mi vida hasta la fecha, etapa con algunos sacrificios, pero llena de aprendizajes, experiencias, buenos recuerdos y que me deja lleno de expectativas de lo que puede venir.

Por lo anterior quiero agradecer a mi directora de maestría la doctora Janneth González, por las oportunidades brindadas, por abrirme las puertas y darme confianza, por su guía, paciencia y apoyo que me ha dado. A mi codirector el doctor Andrés Felipe Aristizábal, por el conocimiento que ha aportado y el apoyo permanente durante esta etapa y al doctor George Emilio Barreto, por su soporte, enseñanzas. Así mismo agradezco a mis compañeros del grupo de bioquímica experimental, computacional y bioinformática, particularmente a Cynthia Martín-Jiménez y Yeimy González Giraldo, a las dos por trabajar conmigo, tenerme paciencia, ayudarme, escucharme y aconsejarme durante los momentos de dificultad en el desarrollo de este trabajo. De verdad mucha gratitud, a todas las personas mencionadas previamente.

Quiero agradecer a la Unidad de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid por el entrenamiento que permitió analizar e interpretar los datos de este proyecto, particularmente a María Luisa Hernández, “Lola” Gutiérrez, Felipe Clemente, Ebrahim Alwashali, la doctora Concha Gil y de manera muy especial por acogerme en ese tiempo como pupilo y por su amistad a Enrique Pérez Navarro. Por otra parte, quiero y siento que debo agradecer a A. E. por todos sus aportes que ha hecho ella a remover barreras en la ciencia.

Por último, mis logros siempre irán dedicados a las personas que siempre han estado conmigo y que más quiero, Principalmente a mi madre Luz Amparo Jiménez que para mí siempre ha sido una representación de su nombre cuidando a toda la gente que le importa, a mi padre Sergio Bernardo Vesga por su apoyo y sabiduría, a mis amigos más cercanos, mis confidentes, por siempre estar ahí, por su ayuda incondicional, de corazón a todos ustedes gracias por formar parte importante de mi vida.

Tabla de contenido

1. RESUMEN DEL PROYECTO	10
2. RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT).....	11
3. INTRODUCCIÓN	13
4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	15
5. Objetivos	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. MARCO TEORICO	16
6.1. Ácido palmítico en el cerebro.....	16
6.2. Astrocytos.....	30
6.3. Desregulación del metabolismo lipídico en astrocytos y la relación con Enfermedades neurodegenerativas	31
6.4. Estrógeno como neuroprotector.....	32
6.5. Receptores de estrógeno	34
6.6. Tibolona desde el enfoque de esteroide neuroactivo.....	35
6.7. Proteómica	38
6.8. Biología de sistemas	44
6.9. Procesamiento de datos a gran escala.....	45
7. METODOLOGÍA	47
7.1. Cultivo celular	47
7.2. Pretratamiento con Tibolona	48
7.3. Daño lipotóxico con ácido palmítico	48
7.4. Extracción y cuantificación de proteínas.....	48
7.5. Digestión de proteínas y carga de las muestras al espectrómetro de masas Q-exactive	49
7.6. Procesamiento de los archivos crudos para la identificación de proteínas.....	50
7.7. Análisis de expresión diferencial.....	51
7.8. Análisis de enriquecimiento funcional	51
7.9. Análisis de co-expresión de redes de proteínas	51

8. RESULTADOS	54
8.1 Perfilado proteómico de astrocitos expuestos al ácido palmítico	54
8.1.1 Identificación de proteínas y cuantificación relativa	54
8.1.2. Análisis de enriquecimiento funcional.....	55
8.2 El ácido palmítico reduce las proteínas relacionadas con los procesos de transcripción y traducción	57
8.3 El ácido palmítico afecta la autofagia y regula a la alta rutas proapoptóticas.....	68
8.4 La tibolona devuelve diferentes proteínas a niveles de expresión comparables a los del control.....	69
8.5 Respuesta de tibolona frente al ácido palmítico	70
8.6. Análisis WGCNA	72
9. DISCUSIÓN.....	79
10. Conclusiones	85
11. RECOMENDACIONES	86
12. BIBLIOGRAFÍA.....	86
12. Material suplementario.....	121

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Tabla de revisión de los efectos de pal en el cerebro.....	22
Tabla 2. Tabla de comparación de diferentes métodos de proteómica.....	42
Tabla 3. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación de pal_vs_veh.....	61
Tabla 4. Proteínas expresadas diferencialmente exclusivas de pal al comparar contra veh.....	64
Tabla 5. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación de tip_vs_pal	67
Tabla 6. Proteínas compartidas de los tratamientos al ser comparados con el control.....	75
Tabla 7. Proteínas expresadas diferencialmente altamente conectadas.....	76
Figura 1. Figura resumen de la metodología seguida paso a paso en este estudio.....	53
Figura 2. Abundancia de proteínas por muestra y replica biológica.....	59
Figura 3. Expresión diferencial de pal_vs_veh.....	60
Figura 4. Proteínas expresadas diferencialmente por el ácido palmítico	62
Figura 5. Expresión diferencial de tip_vs_veh.....	63
Figura 6. Proteínas únicas y compartidas entre tip_vs_veh y pal_vs_veh.....	65
Figura 7. Expresión diferencial de tip_vs_pal	66
Figura 8. Proteínas reguladas por el pretratamiento con tibolona	67
Figura 9. Comparación de la respuesta inducidas por pal y el pretratamiento con tibolona	71
Figura 10. Análisis WGCNA.....	73
Figura 11. Proteínas hub.....	74
Figura 12. Enfermedades asociadas a las proteínas clave únicas del ácido palmítico.....	78

1. RESUMEN DEL PROYECTO

La exposición crónica a grandes cantidades de ácido palmítico (pal) causa daño celular y muerte, un fenómeno que se conoce como lipotoxicidad. La acumulación de pal en el cerebro induce las características distintivas de algunas enfermedades neurodegenerativas (NDs), y causa daño en los diferentes tipos de células cerebrales; particularmente los astrocitos reaccionan volviéndose reactivos e induciendo un bloqueo inicial de la autofagia que, acompañado de otras alteraciones como la inflamación o el estrés de retículo endoplásmico, disminuye la viabilidad de los astrocitos. Al tener diversas funciones en el sistema nervioso como captación de glutamato, soporte metabólico y estructural para el cerebro, liberación de factores neurotróficos y participación en la respuesta inmune en el cerebro, entre otras, es importante la búsqueda de estrategias que permitan proteger a los astrocitos del efecto lipotóxico de pal.

Diferentes compuestos esteroideos han sido estudiados como agentes efectivos en el control de enfermedades inflamatorias, sin embargo, su prescripción es limitada debido a efectos adversos como el aumento de la incidencia de cáncer de útero y mama. Algunos esteroides sintetizados en el sistema nervioso llamados “neuroesteroides”, tienen propiedades neuroprotectoras, que son de particular interés en el tratamiento de enfermedades como demencia, isquemia, trauma cráneo encefálico, epilepsia, enfermedad de Alzheimer (EA) y Parkinson (EP). Debido a estos efectos protectores a nivel cerebral, la investigación se ha centrado en fármacos que generen esos efectos protectores de los estrógenos, pero sin aumentar la incidencia de cáncer de útero y mama, entre estos fármacos se han destacado los (SERMs) por su sigla en inglés Selective Estrogen Receptor Modulators y los (STEARs) por su sigla en inglés Specific Tissue Estrogenic Activity Regulators. Entre estos últimos se resalta la tibolona, un fármaco que cuenta con amplios estudios de sus efectos en la salud y siendo promisorio como agente neuroprotector.

A pesar de que existen amplias investigaciones en neurodegeneración y al tener en cuenta que son enfermedades que pueden activar diferentes vías de señalización haciendo necesarios estudios menos reduccionistas para entender estas enfermedades. Hasta la fecha no se tienen suficientes aproximaciones que evalúen desde una perspectiva holística los cambios a nivel de productos funcionales de proteoma que tienen lugar durante el daño lipotóxico por pal, que nos permitan identificar biomarcadores y proteínas o rutas metabólicas como posibles blancos de terapias, o que

analicen la respuesta a compuestos que potencialmente tienen actividad neuroprotectora con el objetivo de identificar proteínas y sus rutas metabólicas asociadas, relevantes en el proceso de neuroprotección. Asimismo, en la actualidad son escasos los medicamentos o tratamientos efectivos para los procesos neurodegenerativos típicos de estas lesiones, y más allá, es limitado el entendimiento del daño lipotóxico y la respuesta protectora de la tibolona en los diferentes tipos de células del cerebro (neuronas, oligodendrocitos, microglía y astrocitos), haciendo relevante su estudio como posible agente neuroprotector ante un daño lipotóxico inducido por pal.

En general, existe la necesidad de mejorar la calidad de vida de dichos pacientes, aliviar los costos asociados tanto a los diferentes proveedores de salud y las familias que asumen gran parte de los cuidados y del soporte económico. Considerando este panorama que impone un claro problema de investigación, en este estudio se realizó un análisis proteómico exhaustivo del daño lipotóxico desencadenado por pal y la evaluación del efecto neuroprotector del esteroide sintético tibolona, en una línea celular de astrocitos humanos. Los resultados indican la expresión diferencial de proteínas no consideradas anteriormente como las principales causas de daño por pal en los astrocitos humanos. También, se identificaron 27 proteínas expresadas diferencialmente con alto grado de conectividad. A partir del desarrollo del presente estudio, se encontró que pal alteró la expresión de proteínas vinculadas a la síntesis y transporte de proteínas, respuesta viral, y la tibolona moduló la expresión de algunas de esas proteínas a niveles similares a los del control, evitó disrupciones de la autofagia y redujo la expresión de proteínas vinculadas a señales proapoptóticas, demostrando así que la tibolona podría revertir algunas de las alteraciones a nivel de proteínas generada por pal en los astrocitos humanos.

2. RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)

Chronic exposure to large amounts of palmitic acid (pal) causes cell damage and death, a phenomenon known as lipotoxicity. The accumulation of pal in the brain induces the distinctive characteristics of some neurodegenerative diseases (NDs) and causes damage in the different types of brain cells; particularly astrocytes that become reactive and inducing an initial block of autophagy that, accompanied by other alterations such as inflammation or endoplasmic reticulum stress, decrease the viability of astrocytes. As it has various functions in the nervous system such

as glutamate uptake, metabolic and structural support for the brain, the release of neurotrophic factors, and participation in the immune response in the brain, among others, it is important to search for strategies to protect astrocytes of the lipotoxic effect of pal.

Different steroid compounds have been studied as effective agents in the control of inflammatory diseases, however, their prescription is limited due to adverse effects such as the increase in the incidence of uterine and breast cancer. Some steroids synthesized in the nervous system called "neurosteroids" have neuroprotective properties, which are of particular interest in the treatment of diseases such as dementia, ischemia, head trauma, epilepsy, Alzheimer's disease (AD), and Parkinson's disease (PD). Due to these protective effects at the brain level, research has focused on drugs that generate these protective effects of estrogens, but without increasing the incidence of uterine and breast cancer, among these drugs the Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and the Specific Tissue Estrogenic Activity Regulators (STEARs) have been highlighted. Among the latter, tibolone stands out, a drug that has extensive studies of its effects on health and is promising as a neuroprotective agent.

Even though there is extensive research in neurodegeneration and considering that they are diseases that can activate different signaling pathways, making less reductionist studies necessary to understand these diseases. To date, there are not enough approaches that evaluate from a holistic perspective the changes at the level of functional proteome products that take place during lipotoxic damage by pal, which allow us to identify biomarkers and proteins or metabolic pathways as possible targets for therapies, or that analyze the response to compounds that potentially have a neuroprotective activity to identify proteins and their associated metabolic pathways, relevant in the neuroprotection process. Likewise, effective drugs or treatments for the neurodegenerative processes typical of these lesions are currently scarce, and the understanding of lipotoxic damage and the protective response of tibolone in different types of brain cells (neurons, oligodendrocytes, microglia, and astrocytes), making its study relevant as a possible neuroprotective agent against lipotoxic damage induced by pal.

In general, there is a need to improve the quality of life of these patients, alleviate the costs associated with both the different health providers and the families that assume a large part of the

care and financial support. Considering this panorama that imposes a clear research problem, in this study an exhaustive proteomic analysis of the lipotoxic damage triggered by pal and the evaluation of the neuroprotective effect of the synthetic steroid tibolone, in a human astrocyte cell line, was carried out. The results indicate the differential expression of proteins not previously considered as the main causes of pal damage in human astrocytes. Also, 27 differentially expressed proteins with a high degree of connectivity were identified. From the development of the present study, it was found that pal altered the expression of proteins linked to protein synthesis and transport, viral response, and tibolone modulated the expression of some of these proteins at levels similar to those of the control, avoiding disruptions of autophagy and reduced the expression of proteins linked to pro-apoptotic signals, thus demonstrating that tibolone could reverse some of the protein-level alterations generated by pal in human astrocytes.

3. INTRODUCCIÓN

La obesidad se define como la acumulación excesiva de ácidos grasos (AGs) en el tejido adiposo que potencialmente podrían ser perjudiciales para la salud (WHO, 2016). El porcentaje de personas con obesidad en el mundo está creciendo, y esta condición es un factor de riesgo importante para diferentes enfermedades crónicas que matan al menos a 2,8 millones de personas cada año (WHO, 2020). El aumento de peso corporal y el exceso de grasas en la dieta conlleva a un aumento de las concentraciones de pal en el cuerpo (Carta et al., 2017; Tracey et al., 2018). Pal es el ácido graso saturado más común en el cuerpo humano, y es obtenido bien sea por la dieta o sintetizado endógenamente (Carta et al., 2017; Innis, 2016).

El sistema nervioso central es particularmente sensible al estrés oxidativo, debido a un alto consumo de oxígeno y el enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados, por lo que es muy vulnerable a la peroxidación lipídica (Tracey et al., 2018). El estrés oxidativo y las lesiones que causa han sido implicados en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo: EA, EP y Huntington (Anderson et al., 2019; Cakir and Nillni, 2019; Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019; Shamim et al., 2018). Los astrocitos se activan anormalmente en patologías centrales del sistema nervioso, conocidos colectivamente como astrogliosis reactiva, lo que representa un mecanismo de defensa (Cabezas et al., 2014; Liddelow and Sofroniew, 2019); así, este tipo de

célula glial es de importancia crítica para la función normal del cerebro debido a su capacidad para promover activamente la neuroprotección (Acaz-Fonseca et al., 2014).

La exposición de astrocitos a altos niveles de pal puede inducir estrés en el retículo endoplasmático (RE) y deterioro de la autofagia (Ortiz-Rodriguez et al., 2018), liberación de citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, producción de ceramidas y activación astrocitaria (Gupta et al., 2012; Liu et al., 2013; Sofroniew, 2015). Además, pal puede activar receptores tipo toll (TLR) que conducen a la activación de una cascada de señalización mediada por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019; Okun et al., 2009). Tras la activación y la translocación nuclear, NF-κB puede inducir aún más la producción de citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)-6 e IL-1 (Okun et al., 2009). La alteración del equilibrio homeostático de pal en tejidos adiposos y no adiposos desencadena el daño lipotóxico (Sorensen et al., 2010; Unger et al., 2010). Diferentes hallazgos experimentales identifican estas vías proinflamatorias y la disfunción mitocondrial astrocítica como principales contribuyentes a la progresión de diferentes NDs (Liddelow and Sofroniew, 2019; van Horssen et al., 2019). Por lo tanto, se observa que los mecanismos de daño que genera pal en astrocitos son diversos y la mayoría de los estudios encuentran resultados diferentes (Tabla 1) debido a que se centran en mecanismos puntuales. Lo anterior hace relevante el uso de aproximaciones holísticas para tener un mejor entendimiento de los mecanismos asociados al daño lipotóxico por pal en astrocitos humanos.

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado las acciones neuroprotectoras y neurotróficas de los estrógenos en el cerebro (Acaz-Fonseca et al., 2014; Liu et al., 2010). Sin embargo, los riesgos potenciales para la salud asociados con la exposición a los estrógenos, como el aumento de la incidencia de cáncer de útero y de mama pueden impedir su uso a largo plazo (Arevalo et al., 2011; Karki et al., 2014b). Por lo tanto, se ha evaluado el uso de compuestos similares a los estrógenos que provocan selectivamente efectos protectores como agentes terapéuticos como posibles tratamientos de enfermedades neurodegenerativas (Lopez-rodriguez et al., 2011; Lopez-Rodriguez et al., 2015). Entre estos compuestos, ha llamado la atención la tibolona, un esteroide sintético, debido a que muestra efectos benéficos al reducir la muerte celular y el daño mitocondrial contra pal (Ávila Rodriguez et al., 2014; Del Río et al., 2020; Garzón et al., 2016; González-Giraldo et

al., 2018, 2019; Lopez-Rodriguez et al., 2015; Martin-Jiménez et al., 2020; Reed and Kloosterboer, 2004). Sin embargo, los mecanismos de acción subyacentes a sus efectos protectores son en gran parte desconocidos y resulta necesario estudiarlos para entenderlos mejor.

A pesar de la gran relevancia de la lipotoxicidad de los astrocitos en el desarrollo de NDs, su "perfil proteómico" ha sido inexplorado; el estudio más completo hasta la fecha midió un conjunto de 186 proteínas cuyos niveles fueron modulados significativamente por TNF, IL-1 β y LPS (Dozio and Sanchez, 2018). Posteriormente, Rocchio et al., (2019) encontró que las proteínas relacionadas con la unión del ARN y el ribosoma se expresan diferencialmente en un modelo de EA (Rocchio et al., 2019). De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se estudian los cambios del proteoma relacionados al daño lipotóxico y a la respuesta protectora de la tibolona en astrocitos humanos. Los hallazgos muestran cambios inducidos por pal a nivel de modulación de la traducción y transporte de proteínas, reducción de la autofagia y activación de proteínas proapoptóticas; de igual forma se encuentra que la tibolona modula algunas proteínas desreguladas por pal en dichos procesos a niveles similares a los del control.

4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Los astrocitos bajo la influencia del ácido palmítico activan vías vinculadas con la respuesta al estrés y la apoptosis; así mismo la tibolona regula algunas de estas vías permitiendo contrarrestar dichos efectos.

Se probó esta hipótesis en astrocitos humanos estimulados con ácido palmítico, un ácido graso saturado, y tratados con tibolona para fundamentar posibles mecanismos protectores de este compuesto sobre astrocitos en el marco de un daño lipotóxico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar mediante análisis proteómicos la respuesta protectora mediada por el esteroide sintético tibolona frente a un insulto lipotóxico en astrocitos humanos

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el conjunto de proteínas expresadas diferencialmente en astrocitos normales humanos frente al tratamiento con un agente lipotóxico y de la acción protectora mediada por el esteroide sintético tibolona.
- Dilucidar por análisis de enriquecimiento funcional los posibles mecanismos celulares y moleculares asociados a la respuesta protectora mediada por la tibolona frente a un agente lipotóxico

6. MARCO TEORICO

6.1. Ácido palmítico en el cerebro

Diversos estudios han reportado que, en condiciones fisiológicas, las variaciones en la ingesta dietética no influyen significativamente en la concentración de pal en diferentes tejidos tales como musculo esquelético, eritrocitos, corazón, hígado, y cerebro (Carta et al., 2017; Innis and Dyer, 1997; Song et al., 2017), debido a que el humano es capaz de regular la concentración al reducir o aumentar la biosíntesis de pal, sugiriendo que la regulación de sus concentraciones son importantes para el equilibrio homeostático del individuo (Carta et al., 2017); esto se explica, debido a que como resultado de los cambios en la concentración provenientes de una fuente exógena, el sistema puede aumentar o reducir la biosíntesis endógena de pal (Abbott et al., 2012; Carta et al., 2017). Evidenciando que la concentración de pal se encuentra en control homeostático y está altamente regulado en la célula debido a que los cambios en la concentración de pal en la membrana están relacionados con su capacidad de modular las propiedades físicas de la membrana celular (Carta et al., 2017; Innis, 2016). Demostrando que pal representa un 20-30% de los AGs totales en los fosfolípidos de membrana (Carta et al., 2017; Innis, 2016).

Se sabe que pal juega un papel clave en la distribución de las proteínas a través de la membrana mediante un proceso llamado palmitoilación de proteínas y biosíntesis de palmitoiletanolamida (PEA) (Carta et al., 2017; Hansen, 2013; Tsuboi et al., 2013). Curiosamente, la PEA es una amida endógena que se utiliza como mediador de lípidos que exhibe actividades neuroprotectoras, anti-neuroinflamatorias, inmunorreguladoras y analgésicas. Por tanto, la PEA juega un papel clave en

la regulación de sistemas complejos (Carta et al., 2015; Iannotti et al., 2016; Skaper et al., 2015). Por otro lado, otra función de pal es clasificar la distribución de la proteína a lo largo de la membrana mediante la S-palmitoilación. Este mecanismo es una modificación covalente postraduccional de proteínas, que consiste en la adición reversible del pal a cisteínas específicas mediante un enlace tioéster. Su reversibilidad lo convierte en una forma de lipidación, permitiendo su regulación dinámica (Sanders et al., 2015). Este mecanismo aumenta la hidrofobicidad de las proteínas citoplasmáticas y aumenta su afinidad por las superficies de la membrana citosólica (Yang et al., 2010). La S-palmitoilación también permite el ajuste fino de funciones proteicas como la fosforilación o ubiquitinación (Blaskovic et al., 2013). Además, la S-palmitoilación aumenta la hidrofobicidad de las proteínas y por lo tanto modula las interacciones proteína-proteína, induce la inclinación de los dominios transmembrana y podría ejercer sus acciones sobre las proteínas solubles, controlando su asociación con las membranas, el tráfico y la localización de los dominios (Joseph and Nagaraj, 1995; Merrick et al., 2011; Rocks et al., 2005; Salaun et al., 2010).

Se han identificado varias proteínas de mamíferos como blancos de la palmitoilación, muchas de las cuales están asociadas con cáncer, diabetes, esquizofrenia, neurodegeneración, incluida la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, entre otras NDs (Antinone et al., 2013; Young et al., 2012; Zamzow et al., 2019). Proteínas de adhesión celular (Stoeck et al., 2010), CD36 (Thorne et al., 2010), SOD1 (Rothstein, 2009), LG11; NPC1 implicado en la EA (Malnar et al., 2014), muchos receptores acoplados a proteína G (Maeda et al., 2010), canales y transportadores (Crane et al., 2009; Du et al., 2017; Jeffries et al., 2010; Mueller et al., 2010), múltiples receptores como NMDAR en la corteza frontal (Liu et al., 2012; Lu and Roche, 2012; Oddi et al., 2011; Yang et al., 2011; Zamzow et al., 2019; Zheng et al., 2012) y chaperonas como la co-chaperona presináptica CSP α (Carta et al., 2017; Henderson et al., 2016; Lakkaraju et al., 2012).

Se ha demostrado que la palmitoilación de proteínas de membrana promueve su asociación con microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos o balsas lipídicas (Levental et al., 2010). Las balsas lipídicas parecen actuar como plataformas al reunir varios componentes de señalización y facilitar su interacción, como las proteínas involucradas en la transducción de señales (Simons and Toomre, 2000). La palmitoilación puede aumentar la afinidad de las proteínas por estos microdominios (Carta et al., 2017; Melkonian et al., 1999). Sin embargo, no se comprende bien cómo la palmitoilación influye en la asociación de proteínas a las balsas; una posible

explicación puede ser la afinidad del pal por diferentes lípidos o dominios lipídicos (Henis et al., 2009). Recientemente, varios estudios se han centrado en determinar el papel crucial de la palmitoilación en diversos tipos de células, incluidas las células endoteliales, inmunes y neuronales (Kang et al., 2008, 2019; Sohn and Park, 2019; Yang and Li, 2012). Se ha demostrado que la palmitoilación tiene importantes funciones reguladoras en el sistema nervioso central (CNS), como la liberación de neurotransmisores a través de la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25a/b). SANP-25 a/b son proteínas receptoras de proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE) que están altamente expresadas en el cerebro y son proteínas de membrana palmitoiladas esenciales para la exocitosis de neurotransmisores de terminales sinápticos (Gonzalo and Linder, 1998; Greaves et al., 2010). La palmitoilación también representa una modificación postraduccional común de los receptores de neurotransmisores, incluidos los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y los canales iónicos activados por ligando (LIC). Además, estas modificaciones producen cambios en las propiedades biofísicas de la proteína diana y afectan la ubicación de la membrana y la asociación del dominio lipídico de los receptores de neurotransmisores (Borroni et al., 2016). Desde el punto de vista funcional, la palmitoilación afecta a una amplia gama de actividades de los receptores de neurotransmisores, incluido su tráfico, clasificación, estabilidad, vida en la superficie celular, endocitosis, reciclaje y agrupación sináptica (Naumenko and Ponimaskin, 2018), palmitoilación y despalmítoilación en la densidad postsináptica 95 (PSD-95), la principal proteína de densidad en la región postsináptica en las sinapsis excitadoras, regula el número de receptores sinápticos del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPAR) (Sohn and Park, 2019; Zaręba-Kozioł et al., 2018). Sin embargo, la palmitoilación afecta a los receptores de diversos neurotransmisores como acetilcolina, glutamato (NMDA, AMPA & Kainato), GABA, dopamina, serotonina y otros (Naumenko and Ponimaskin, 2018). Por lo tanto, es necesario un mayor análisis para comprender mejor las funciones de la palmitoilación en el CNS (Naumenko and Ponimaskin, 2018).

Aunque el equilibrio homeostático de los lípidos en el cerebro está altamente regulado, una dieta alta en grasas (HFD) a largo plazo con un alto porcentaje de AGs saturados puede alterar el perfil lipídico (Giles et al., 2016). La exposición constante a grandes cantidades de AGs combinada con una mayor proporción de su ingesta sobre su oxidación puede causar efectos perjudiciales como

daño celular, inflamación o muerte celular, una condición denominada lipotoxicidad (Engin, 2017; Park et al., 2011; Unger et al., 2010; Virtue and Vidal-Puig, 2010). La lipotoxicidad es un estado alostático provocado por la acumulación constante de AGs en el tejido no adiposo debido al excedente calórico (Unger et al., 2010), provocando disfunción e incluso puede afectar la supervivencia de células, tejidos y órganos como el cerebro (Engin, 2017; Park et al., 2011; Unger et al., 2010; Virtue and Vidal-Puig, 2010).

Estudios recientes han demostrado que los AGs pueden acumularse en el cerebro cuando hay grandes cantidades de ellos circulando en el cuerpo (Rhea et al., 2017). Por ejemplo, en modelos animales de obesidad, se ha informado de una interrupción de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que permite un mayor paso de AGs al cerebro (Rhea et al., 2017). Karmi et al., (2010) evidencio que, en los seres humanos, pal podría pasar a través de la BHE al cerebro mediante una inyección intravenosa de palmitato radiomarcado (Karmi et al., 2010). Los autores encontraron que los pacientes con esclerosis múltiple tenían un aumento del 50% en AGs y un aumento del 86% en la captación de pal en el cerebro en comparación con sujetos sanos (Karmi et al., 2010). Además, también se ha demostrado que el pal se acumula en el cerebro de los monos, esto se evidenció usando tomografía por emisión de positrones y palmitato marcado (Arai et al., 1995), y en ratas despiertas, midiendo la concentración de pal en el núcleo arcuado (Kimes et al., 1983), esto sugiere que el pal se transporta a través del BHE (Rhea et al., 2017). Esto es importante porque se ha observado que la acumulación de pal puede inducir la liberación de factores proinflamatorios como TNF- α e IL-6 en los astrocitos (Gupta et al., 2012). Esta inflamación puede ser una causa tanto de la interrupción de la BHE como del incremento de la infiltración de las células inmunes que se infiltran en el CNS (Nerurkar et al., 2011; Tucsek et al., 2014). En este sentido, se ha demostrado que los monocitos podrían infiltrarse en el cerebro del ratón después de 15 semanas de HFD, y existe una correlación entre el número de macrófagos derivados de monocitos en el cerebro y el peso corporal (Buckman et al., 2014).

Un estudio en murinos muestra que la alimentación con HFD, que contiene aproximadamente un 40-45% de grasa compuesta principalmente por ácidos grasos saturados, conduce a la apoptosis de las neuronas y a una reducción de las entradas sinápticas en el núcleo arqueado y el hipotálamo lateral (Moraes et al., 2009; Rhea et al., 2017). Además, otro estudio examinó la interrupción de la BHE en la descendencia de animales alimentados con HFD, la descendencia de ratones alimentados

con una HFD mostró mayor interrupción en la BHE, probablemente debido a una reducción en los procesos de un tipo especial de células ependimarias llamadas tanicitos. Los cuerpos celulares de los tanicitos se encuentran en el tercer ventrículo y proyectan procesos hacia el parénquima cerebral, en el que entran en contacto con las neuronas del núcleo arcuado (ARC) y las células endoteliales (Kim et al., 2016). Se cree que los tanicitos forman una barrera física pasiva que evita que las moléculas de la eminencia media se difundan dorsalmente en el ARC (Rodríguez et al., 2005).

La obesidad y la HFD crónica, especialmente las dietas ricas en grasas saturadas se han asociado con una función cognitiva reducida tanto en humanos como en animales (Cook et al., 2017; Farr et al., 2008; Goodman and Hajhosseini, 2015; Prickett et al., 2015; Rhea et al., 2017; Tan and Norhaizan, 2019; Walker et al., 2017). Por ejemplo, los ratones a los que se les infundió pal han desarrollado una plasticidad sináptica deteriorada y su memoria se vio afectada por la microglía activada y la liberación de TNF- α (Melo et al., 2020). El hipocampo, una región del cerebro relacionada con el aprendizaje y la memoria, parece especialmente afectado por el exceso de AGs. Además, McLean et al., (2018) revelaron que los ratones alimentados con una HFD durante un día eran suficientes para inducir una caída en el rendimiento de la memoria episódica (McLean et al., 2018). Además, los ratones orexina/ataxina-3 (ratones transgénicos para experimentos de neurodegeneración) alimentados con HFD aceleran la memoria dependiente del hipocampo de evitación activa bidireccional que implica el aprendizaje y la utilización de estímulos en el entorno espacial (Duffy et al., 2019; Granholm et al., 2008; Stranahan et al., 2008). Probablemente, porque las poblaciones neuronales dentro del hipocampo tienen una demanda metabólica particularmente alta, lo que las hace vulnerables a una variedad de factores ambientales y biológicos (Rhea et al., 2017).

De manera similar, Giles et al., (2016) mostraron una relación entre la concentración plasmática de AGs y dos regiones del cerebro utilizando análisis multivariante descubrieron que la alimentación a largo plazo con dietas enriquecidas con AGs saturados en ratones conduce a cambios en los lipidomas del hipocampo y la corteza cerebral (Giles et al., 2016). Además, se ha encontrado que los niveles de pal están aumentados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de humanos con obesidad, lo que se correlacionó inversamente con el rendimiento cognitivo (Melo et al., 2020). La exposición a pal da como resultado la activación de la proteína quinasa C (PKC) θ ,

que se asocia con la señalización de leptina y reduce la sensibilidad a la insulina en las células N43 / 5 del hipotálamo (Benoit et al., 2009; Hernández-Cáceres et al., 2019). Por otro lado, diferentes estudios han revelado que el exceso de pal puede activar la vía de las ceramidas (Holland et al., 2007). Probablemente, la ceramida bloquea la fosforilación de Akt / PKB y / o estimula la proteína fosfatasa 2A (Chavez et al., 2005; Drosatos and Schulze, 2013). Campana et al., (2018) encontraron que las células neuronales hipotalámicas (GT1-7) tratadas con pal a 500 y 1000 µM durante 24 h causaron resistencia a la insulina. La síntesis de ceramida fue inhibida de manera farmacológica con miriocina o molecular si-serina palmitoil transferasa 2, lo que demuestra que el palmitato alteraba la señalización de la insulina y aumentaba los niveles de ceramida en las células GT1-7. De manera similar, el inhibidor de PKC contrarrestó la resistencia a la insulina inducida por pal (Campana et al., 2018).

Algunos estudios han asociado los AGs saturados como causa principal de muerte celular (Drosatos and Schulze, 2013). Al respecto, se ha reportado que el pal podría afectar la viabilidad celular de diferentes células cerebrales como el neuroblastoma SH-SY5 (Hsiao et al., 2014); células microgliales BV-2 (Hidalgo-Lanussa et al., 2018); neuronas primarias (Park et al., 2011); astrocitos primarios (Frago et al., 2017; Martin-Jiménez et al., 2020; Ortiz-Rodriguez et al., 2018; Ramírez et al., 2019); células primarias de microglía (Tu et al., 2019); glioblastoma T98G (González-Giraldo et al., 2018; Hsiao et al., 2014). Aunque se sabe que el pal podría afectar a las diferentes células cerebrales a través de diferentes mecanismos celulares, que hasta el momento no son del todo claros. La muerte celular inducida por AGs saturados se ha atribuido a la síntesis de ceramida; cambios en el equilibrio del contenido de lípidos celulares; exceso de oxidación de lípidos; Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hickson-Bick et al., 2002; Listenberger et al., 2001) señal de inflamación (Rhea et al., 2017; Wang et al., 2012), estrés del RE (Hsiao et al., 2014) y activación de receptores de muerte (Ulloth et al., 2003). Los datos experimentales resumidos de los mecanismos estudiados de daño en el cerebro causado por pal se relacionan en la (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos del ácido palmítico en diferentes células del sistema nervioso

Referencias	Especies	Células	Modelo	[] pal (μ M) & tiempo	Efectos
(Liu & Chan, 2014)	Rata	Astrocitos y neuronas primarios	<i>In vitro</i>	400 (24h)	Activación del inflamosoma IPAF-ASC en astrocitos que conduce a la maduración de IL-1 β y en las neuronas tratadas con el medio acondicionado de astrocitos sometidos a pal, mostraron aumento de amiloide β 42.
(Blázquez et al., 2000)	Rata	Astrocitos corticales	<i>In vitro</i>	200 (24h, 48h & 72h)	pal induce la apoptosis e implica la síntesis <i>de Novo</i> de ceramida a través de la vía del protooncogén serina / treonina-proteína quinasa RAF (Raf-1) / quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).
(Patil et al., 2007)	Rata	Astrocitos corticales	<i>In vitro</i>	200 (24h)	pal reduce la expresión de GLUT1, la captación de glucosa y la liberación de lactato. Formación de ROS en la mitocondria, perdida del potencial de membrana mitocondrial (PMM) e inducción de apoptosis;

					excluyendo la participación del estrés RE en la lipotoxicidad causada por pal
(Wong et al., 2014)	Ratón	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	100 (24h)	Formación de ROS en la mitocondria, perdida de PMM y apoptosis; excluyendo la participación del estrés RE en la toxicidad generada por pal.
(Ramírez et al., 2019)	Ratón	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	100 (24h)	pal activa la ruta del factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2 (Nrf2), redujo la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la viabilidad celular.
(Frago et al., 2017)	Rata (Macho & hembra)	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	500 (24h)	pal redujo la activación de ERK; Akt y la expresión de IL-10 y la aromatasa, pal también aumento la activación de las proteínas quininas activadas por mitógenos P38; JNK y la expresión de IL-6; Proteína homóloga C / EBP (CHOP) y caspasa 3 Están relacionadas con el estrés del RE.
(Yudkoff et al., 1989)	Rata	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	360-720 (24h)	pal redujo las concentraciones

					intracelulares de glutamina e incremento las concentraciones de taurina, isoleucina y leucina.
(Ramírez et al., 2019)	Ratón	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	200 (2h;6h; 24h); HFD 50% (8 semanas)	pal aumento la producción de ROS y redujo la expresión de SOD y en el modelo animal también se redujo la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).
(Escartin et al., 2007)	Rata	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	200 (24h)	Factor neurotrófico ciliar genera resistencia en los astrocitos que mostraron perfiles metabólicos alterados e inhibidos por pal.
(Ortiz-Rodriguez et al., 2018)	Ratón prenatal (Macho & Hembra)	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	250- 500 (24h)	pal redujo Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3-II) un marcador de autofagia y aumento la expresión de CHOP, IL-6 y únicamente en machos TNF- α . Aumentando la muerte celular.
(Gupta et al., 2012)	Rata	Astrocitos primarios	<i>In vitro</i>	200 (18h)	Los astrocitos tratados con pal liberaron IL-6 y TNF- α vía TLR4, pero no JNK y TLR2.

(González-Giraldo et al., 2019)	Humano	Astrocitos T98G	<i>In vitro</i>	1000 (24h)	pal aumento la expresión de los genes IL6, TERT, TERC, DNMT3B, ESR1 and MIR155 y redujo CREB1, ALDH1L1, IL1B y MIR125a.
(González-Giraldo et al., 2018)	Humano	Astrocitos T98G	<i>In vitro</i>	1000 (24h)	pal redujo el potencial de membrana mitocondrial, la cardiolipina y la viabilidad celular.
(Ng & Say, 2018)	Humano	Astrocitos T98G & Neuronas SH-SY5Y	<i>In vitro</i>	100- 500 (24h & 48h)	pal aumenta la muerte celular apoptótica en líneas celulares SH-SY5Y y T98G; concentraciones similares de tratamiento con pal mostraron un porcentaje mucho más bajo de apoptosis en T98G. Indicando que las neuronas son más susceptibles al pal. Estos resultados se asociaron con un aumento de la peroxidación lipídica y la producción de ROS.
(Melo et al., 2020)	Rata	Astrocitos, microglía	<i>In vitro</i>	HFD 35% (16 semanas)	pal induce la activación astrogrial y microglial en el hipocampo del ratón, y su impacto deletéreo está mediado por la señalización de TNF-α derivado de la microglía.

(Morselli et al., 2015)	Ratón (Macho & Hembra)	Cerebro	<i>In vivo</i>	HFD 42% (16 semanas)	HFD rica en AGs saturados causo inflamación hipotalámica, principalmente en machos, esto se relacionó con una reducción en la concentración de AGs Poliinsaturados (PUFAs) en el cerebro y la regulación a la baja de proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1α)/Era.
(Douglass et al., 2017)	Ratón	Cerebro	<i>In vivo</i>	HFD 60% (8 semanas)	HFD rica en AGs saturados causo inflamación hipotalámica y astrocitosis a través de la activación de Nf-kB y IKKβ.
(Portovedo et al., 2015)	Rata	Cerebro	<i>In vivo</i>	HFD 35% 8-16 semanas	Inyecciones intra-cerebro-ventriculares de pal y HFD aumentaron la expresión de marcadores de inflamación y regularon a la baja proteínas de autofagia.
(Kim et al., 2017)	Ratón	Cerebro y Neuroepiteloma (SK-N-MC)	<i>In vitro-</i> <i>In vivo</i>	50 (0-48h); HFD 20%(5)	pal aumento la expresión de proteína precursora amiloide (APP) y la β-secretasa 1 (BACE1) y la producción de péptido beta

				semanas)	amiloide ($A\beta$) a través del receptor 40 acoplado a proteína G (GPR40). pal acoplado a GPR40 redujo significativamente la activación de Akt la cual es requerida para la expresión de HIF-1 α y la fosforilación de NF- κ B mediadas por mTOR/p70S6K1 favoreciendo la actividad transcripcional de los genes APP y BACE1. Adicionalmente, al silenciar APP y BACE1, se redujo significativamente la producción de $A\beta$ en células SK-N-MC sometidas a pal.
(Calvo-Ochoa et al., 2017)	Rata	Células humanas diferencias de neuroblastoma (MSN)	<i>In vitro</i>	200(24h)	Inhibición de la ruta de insulina/PI3K/Akt.
(Buratta et al., 2008)	Humano	Glioblastoma GL15	<i>In vitro</i>	600(36h)	pal generó la pérdida de la cardiolipina la cual se relaciona a la apoptosis vía la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 3.

(Hernández-Cáceres et al., 2019)	Rata	Línea celular hipotalámica N43/5	<i>In vitro</i>	100(24h)	pal activa GPR40 e inhibió el flujo autofágico y la sensibilidad a la insulina.
(Tu et al., 2019)	Ratón	Microglía BV-2	<i>In vitro</i> - <i>In vivo</i>	200 (4h); HFD 60% (4 semanas)	Aumento de la expresión de IL-6; IL-1 β ; TNF- α ; COX2; de la proporción entre pERK/ERK y la reducción de I κ B α un inhibidor de Nf-kB; observando el mismo efecto en los modelos animales más la activación de la microglía.
(Hidalgo-Lanussa et al., 2018)	Ratón	Microglía BV-2	<i>In vitro</i>	250 (12h)	pal incrementó la producción de ROS y de Nf-kB , también redujo el PMM, la cardiolipina y la viabilidad celular.
(Tracy et al., 2013)	Rata	Microglía BV-2	<i>In vitro</i>	125 (24h)	pal induce la activación de la microglía, aumentando los niveles de mRNA de citocinas proinflamatorias IL-1 β and IL-6.
(Wang et al., 2012)	Ratón	Microglía Primaria	<i>In vitro</i>	25-200 (6h & 24h)	pal aumenta la expresión de IL-6 y la activación mediada por TLR4de NF-kB, que conduce al incremento de TNF-a, IL-1b y la producción de óxido nitroso.

(Hsiao et al., 2014)	Humano	Neuronas SH-SY5Y	<i>In vitro</i>	100- 500 (24h & 48h)	Apoptosis de células neuronales, arresto del ciclo celular G2/M, acumulación de A β , y el aumento del estrés del RE y todos esos efectos fueron reversados al inhibir la palmitoilación de las proteínas.
(Park et al., 2011)	Ratón prenatal	Neuronas, células progenitoras neuronales (NPCs)	<i>In vitro</i>	50, 100, 200, 400 (24h)	pal redujo la viabilidad de las NPCs y su proliferación elevando el estrés oxidativo intracelular. Además, una dieta HFD a corto plazo enriquecida en pal afectó la neurogénesis del hipocampo reduciendo la supervivencia de las células que se generan y de los niveles de BDNF en el hipocampo.
(Sergi et al., 2018)	Ratón	Neuronas primarias	<i>In vitro</i>	200 (6h-24h)	pal induce la expresión de IL-6 y TNF- α independientemente de la activación de TLR4, pero, parcialmente, vía síntesis de ceramida.
(Yan et al., 2016)a	Rata	Células retiniales ganglionares RGC-5	<i>In vitro</i>	100(24h)	Aumento la muerte celular por el incremento de ROS

Tabla de revisión sobre los efectos que genera pal y en cerebro y sus diferentes células, la concentración usada de pal en los estudios fue transformada a μM . Abreviaciones h = horas, HFD = dieta rica en grasas saturadas.

6.2. Astrocytos

Los astrocitos son células gliales que tienen funciones en el CNS de soporte estructural y metabólico (Brown and Ransom, 2007; Buckman et al., 2014; Cabezas et al., 2014). Entre sus funciones están: el acoplamiento intercelular a través de canales de unión GAP, captación de neurotransmisores como el glutamato para evitar la excitotoxicidad en las neuronas, señalización de calcio, gliotransmisión, participación en la sinapsis tripartita (Garzón et al., 2016; Ricci et al., 2009; Steele and Robinson, 2012). Los astrocitos mediante las uniones GAP, intercambian iones con las neuronas, liberan factores neurotróficos los cuales median señalamientos relevantes para el funcionamiento neuronal (Pannasch and Rouach, 2013). A nivel metabólico los astrocitos son los responsables de múltiples funciones. Dentro de éstas incluye la captación de glucosa (Bélanger et al., 2011), el almacenamiento y síntesis de glucógeno (Brown and Ransom, 2007; Pellerin and Magistretti, 2012), consumo de ácidos grasos para brindar lactato a las neuronas (Panov et al., 2014), porque además de contar con una estructura celular única que les permite no solo percibir cualquier cambio en el entorno y responder dinámicamente a los cambios extracelulares también pueden responder o contribuir a los requerimientos metabólicos neuronales, proporcionando fuentes de energía a partir de sustratos captados desde el flujo sanguíneo (Bélanger et al., 2011). Los astrocitos también tienen otras funciones que son consideradas fundamentales para el funcionamiento neuronal, debido a que degradan la glucosa hasta producir lactato el cual será transportando a las neuronas para ser usado para suplir su demanda metabólica (Dringen and Hirrlinger, 2003) y también captan el glutamato el principal neurotransmisor excitatorio evitando el daño neuronal por excitotoxicidad (Garzón et al., 2016) y adicionalmente lo astrocitos transforman el glutamato, en glutamina y lo transportan nuevamente a las neuronas para que pueda ser usado en sus demandas metabólicas o para sintetizar nuevamente glutamato (Lee et al., 2010). Esta propiedad se cumple por la presencia específica de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) 1 y 2 que se encuentran en la membrana plasmática de los astrocitos y en el cerebelo las células Bergman (Medina-Ceja et al., 2007; Pellerin and Magistretti, 2012). Además, estas células cuentan con sistemas antioxidantes especiales entre los cuales están el glutatión peroxidasa, la hemo oxigenasa I y la catalasa, enzimas antioxidantes que tienen la finalidad de

proteger al cerebro del exceso de ROS (Bélanger et al., 2011; Shih et al., 2003). Asimismo, se han reportado los astrocitos como las células que apoyan considerablemente el sostenimiento de la BHE (Bak et al., 2006) y la producción de factores de crecimiento (Chen and Swanson, 2003). En conjunto estas funciones son consideradas esenciales para el mantenimiento funcional del sistema nervioso central y para su reparación durante los episodios de lesión o insulto (Garzón et al., 2016; Karki et al., 2014a).

6.3. Desregulación del metabolismo lipídico en astrocitos y la relación con Enfermedades neurodegenerativas

Los lípidos juegan un papel fundamental en la función de los astrocitos, incluida la generación de energía, la fluidez de la membrana y la señalización de célula a célula. En la actualidad, existe evidencia emergente de que el almacenamiento de lípidos en los astrocitos en las “lipid-droplets” (LD) cumple un papel fisiológico y protector para el CNS, generando una respuesta rápida ante el aumento o depleción de los AGs (Lee et al., 2020). Esto vincula la β -oxidación en los astrocitos con la inflamación, la señalización, el estrés oxidativo y la generación de energía mitocondrial en las neuronas. La alteración del metabolismo, la estructura y la señalización de los lípidos en los astrocitos puede conducir a mecanismos patogénicos asociados con una variedad de enfermedades neurológicas. (Lee et al., 2020).

Se ha observado la relación entre la obesidad y daños al cerebro y diferentes NDs, como EP y EA (Martin-Jiménez et al., 2016; Miller and Spencer, 2014; Rhea et al., 2017). En personas obesas los astrocitos pueden mostrar fallas en sus funciones homeostáticas normales y el aumento de metabolitos tóxicos tras el evento patológico (Martin-Jiménez et al., 2017), generando señales moleculares que inducen la activación y migración de los astrocitos al sitio de la lesión, volviéndose reactivos, proceso conocido como gliosis (Martin-Jiménez et al., 2017). Los astrocitos reactivos juegan un papel complejo en diferentes situaciones patológicas favoreciendo la respuesta inmune, pero si su reactividad se torna crónica puede causar daños o dificultar la recuperación neuronal, durante el proceso de las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos responden y alteran drásticamente sus fenotipos aumentando de tamaño, favoreciendo su proliferación y liberación de factores pro inflamatorios (Cabezas et al., 2014; Karki et al., 2014a; Pekny and Pekna, 2014). Recientemente, un estudio de Chen et al. ha descubierto que la delección específica de astrocitos de SRY-box 2 (Sox2) en ratones adultos disminuye en gran medida la respuesta glial a una lesión por

impacto cortical controlada y beneficia la recuperación conductual de los ratones después de una lesión cerebral traumática (Chen et al., 2019). Estos datos sugieren fuertemente que las vías dependientes de Sox2 en los astrocitos reactivos pueden estar específicamente dirigidas a la recuperación cerebral después de una lesión (Li et al., 2019).

Se han identificado dos fenotipos distintos de astrocitos reactivos en ratones, dependiendo de la lesión de inicio, en los que los A1 son inducidos principalmente por inflamación inducida por lipopolisacáridos, mientras que los A2 son causados principalmente por isquemia. Como se describe en esta revisión, en NDs, como EA, EP, Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y Esclerosis múltiple, los astrocitos reactivos pueden involucrar funciones neuroprotectoras y neurodegenerativas. Este efecto depende en gran medida de las moléculas que producen y secretan en el microambiente alrededor de las neuronas (Li et al., 2019).

Por otra parte, Los astrocitos juegan un papel fundamental no sólo en la degeneración específica de las neuronas motoras espinales en la ELA, sino también en la neurodegeneración en otras partes del CNS en una amplia gama de NDs, tanto por ganancia como por pérdida de funciones, tanto en humanos como en modelos de enfermedad en roedores. La identificación de factores solubles derivados de astrocitos responsables tendrá un gran alcance e implicaciones para la investigación básica, mecanicista y traslacional (Liddelow and Sofroniew, 2019).

6.4. Estrógeno como neuroprotector

El estrógeno es una hormona sexual femenina que tiene como función el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, acumulación de grasa y regulación del ciclo femenino (Lizcano and Guzmán, 2014; Sadava et al., 2014). Se sabe que al entrar a la menopausia que al entrar en la menopausia se reduce considerablemente la producción de estrógeno, generando diversos efectos en las mujeres tales como, osteoporosis, aumento de peso, perdida de libido, sequedad vaginal (Kloosterboer, 2011). Adicionalmente, se descubrió que al llegar a la menopausia las mujeres empezaron a mostrar déficit de atención y memoria, posteriormente se empezó a aplicar la terapia de reemplazo hormonal usando estrógenos, donde se evidenció que las mujeres que estaban bajo esta terapia mostraban mejores resultados en memoria verbal y visual que el grupo control (Zhao et al., 2005); así mismo se evidenció que si la terapia se empezaba poco después del inicio de la

menopausia se recuperaban completamente las facultades mencionadas anteriormente, pero si se empezaba la terapia mucho tiempo después del inicio de la menopausia mostraban una mejora, pero no lograban tener una recuperación total, teniendo en cuenta su estado previo a la menopausia (Zhao et al., 2005). Se han observado los efectos neuroprotectores del estrógeno en diversos modelos, entre ellos roedores (ratones, ratas y jerbos), donde se reportó, que después de una lesión traumática cerebral, disminuía la mortalidad y tenían mayor recuperación las hembras que los machos; además, estudios han reportado que al inhibir la enzima Citocromo P450 aromatasa, encargada de la biosíntesis del estrógeno, también se reducían los efectos neuroprotectores, al compararlos con animales control con la aromatasa funcional (Brann et al., 2007; Liu et al., 2007). Así mismo, se mostró que las mujeres tienen menores daños y tasas de fatalidad en los derrames cerebrales al ser comparadas con los hombres (Brann et al., 2007). Los efectos protectores del estrógeno también se observan en otras células como microglía y astrocitos, en la microglía la reactividad excesiva con lleva a aumentar los procesos inflamatorios, causando efectos nocivos para el sistema nervioso y el tratamiento con estrógeno es capaz de reducir la actividad de la microglía disminuyendo la inflamación y los daños causados por esta, mediante la disminución de la expresión: Nf- κ B, I κ B y iNOS (Acaz-Fonseca et al., 2014; Brann et al., 2007; Lanussa et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado que los estrógenos aumentan la liberación del factor de crecimiento TGF- β el cual favorece a la neuroprotección (Acaz-Fonseca et al., 2014); así mismo el estrógeno promueve la liberación de glutamina por parte de los astrocitos (Brann et al., 2007), la cual es usada por las neuronas para la síntesis del glutamato, además el estrógeno aumenta la expresión de los transportadores de transportador glutamato aspartato (GLAST) y el transportador de glutamato 1 (GLT-1) en astrocitos mediante los factores TGF- α y TGF- β , reduciendo de esta manera la toxicidad del medio, por otro lado el β -estradiol eleva la expresión de otros factores neuroprotectores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico inducido de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Brann et al., 2007; Karki et al., 2014a). Además, el estrógeno reduce la proliferación excesiva e inflamación de los astrocitos, atenuando los daños causados por el proceso de gliosis. Por otra parte, el estrógeno tiene la capacidad de controlar la producción de NO por medio de la óxido nítrico sintasa (iNOS), protege las mitocondrias al regular la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, el glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Garzón et al., 2016). La respuesta del estrógeno

es modulada por la interacción de este mismo con los receptores de estrógeno α , β y GPR30, desencadenando diversas respuestas (Brann et al., 2007; Garzón et al., 2016; Karki et al., 2014b, 2014a).

6.5. Receptores de estrógeno

Los receptores de estrógeno se dividen en dos tipos que son el receptor de estrógeno α y el receptor de estrógeno β (Zhao et al., 2005). Pertenece a un mismo grupo de receptores, que comparten características con la super familia de receptores nucleares, los cuales se componen de un extremo N-terminal que sirve para su activación, un dominio altamente conservado de unión al ADN y un motivo de 4 dedos de Zinc (Zhao et al., 2005). Los receptores de estrógeno pueden ubicarse en diferentes regiones celulares como en el citoplasma, núcleo y del RE (Govind et al., 2003; Welsh et al., 2012; Yang et al., 2004). Cuando hay interacción entre el receptor de estrógeno y el estrógeno, ocurre una translocación del receptor al núcleo de la célula seguido por la unión a sus elementos de respuesta a estrógeno ubicados en el ADN (Rey et al., 2009).

Algunos de los mecanismos genómicos de protección del estrógeno que se han descrito son el aumento de la expresión del gen anti apoptótico bcl-2 en neuronas tanto de ratas como de humanos y también la reducción producción del gen proapoptótico BAD (Arevalo et al., 2015). Además de sus acciones genómicas, el estradiol también tiene mecanismos no genómicos mediados por los receptores GPR30/GPER1 y se ubican en el RE y/o en la membrana celular generando respuestas protectoras rápidas, pero de menor duración (McEwen et al., 2012; Wang et al., 2014).

Los astrocitos expresan ambos receptores de estrógeno (α y β) y el receptor GPR30 (Karki et al., 2014b). Las respuestas no genómicas del estrógeno ayudan a potenciar la activación de ERK y Akt en la corteza cerebral, donde Akt inactiva las quinasas apoptóticas BAD y GSK-3 β (Karki et al., 2014b). Además después de una isquemia en el hipocampo Akt está asociado con la reducción de los factores proapoptóticos MLK3-Mkk4/7-JNK1/2 en la región CA1 del hipocampo (Brann et al., 2007). Por otra parte, el estrógeno hace que los astrocitos reduzcan la cantidad de citoquinas proinflamatorias y liberen factores con efecto neuroprotector (Karki et al., 2014b). Sin embargo, el estrógeno tiene efectos negativos en el cuerpo ya que su uso se ha relacionado con un aumento en la incidencia de cáncer en los tejidos de útero y mama, por esta razón se han empezado a utilizar

diferentes compuestos que eviten los efectos secundarios del estrógeno (Arevalo et al., 2011; Garzón et al., 2016; Lopez-Rodriguez et al., 2015).

6.6. Tibolona desde el enfoque de esteroide neuroactivo

Los STEARs se definen como compuestos con actividad estrogénica y que tienen modo de acción selectivo de tejidos y un particular metabolismo que regula los niveles de ligandos, según Reed y Kloosterboer (2004), STEARs también muestran 1) acción estrogénica sobre el hueso, vagina y cerebro sin afectar la mama o el endometrio, 2) modulación previa a la unión con el receptor de los ligandos y 3) efectos agonistas sobre el receptor alfa de estrógenos (Reed and Kloosterboer, 2004).

La molécula insignia de los STEARs, para el uso de la terapia de reemplazo hormonal es la tibolona (Reed and Kloosterboer, 2004). Debido a que ayuda con síntomas como la sequedad vaginal, aumenta densidad ósea, libido, generando menos efectos adversos que otros compuestos de la terapia de reemplazo hormonal (Gupta et al., 2013; Lopez-Rodriguez et al., 2015). Este esteroide sintético tiene actividad, androgénica, progestogénica y estrogénica (Lopez-Rodriguez et al., 2015).

La tibolona se metaboliza generando tres metabolitos diferentes: 3-alfa-hidroxi y 3-beta-hidroxi tibolona producidas por acción de la 3-alfa y 3-beta-hidroxiesteroid deshidrogenasa y delta-4 tibolona que es un isómero metabolizado por la 3-beta-hidroxiesteroid deshidrogenasa (Escande et al., 2009; Kloosterboer, 2001; Lopez-Rodriguez et al., 2015), teniendo 3-alfa- y 3-beta-hidroxi-tibolona como compuestos con acción estrogénica y la delta-4 tibolona con acción progestogénica y androgénica (Escande et al., 2009; Guzmán et al., 2007). Es importante resaltar que este último metabolito se forma en el endometrio, previniendo la acción estrogénica en el endometrio (Del Río et al., 2020; Kloosterboer, 2011), así protegiendo este tejido de cáncer por respuesta estrogénica (Modelska and Cummings, 2002). Por otra parte, ambos metabolitos estrogénicos están formados por enzimas aldo-ceto reductasa (AKR), el hígado tiene la enzima específica AKR1C4 que produce predominantemente 3-alfa-hidroxi-tibolona (Steckelbroeck et al., 2006). Mientras que las enzimas AKR1C1 y AKR1C2, se expresan predominantemente en las gónadas, las glándulas suprarrenales y el cerebro (Khanna et al., 1995), y producen 3-beta-hidroxi-tibolona (Verheul and Kloosterboer,

2006). Estos metabolitos son agonistas del receptor de estrógeno y se unen preferentemente al receptor de estrógeno α (Del Río et al., 2020; Kloosterboer, 2004). Aunque los mecanismos de neuroprotección aún no se han dilucidado completamente estudios en animales sugieren que puedes ser útil ante determinados tipos de daño neuronal (Pinto-Almazán et al., 2017).

Entre los factores inductores de daño que se han investigado están la menopausia (Albertazzi et al., 2000; Fluck et al., 2002; Gupta et al., 2013; Somunkiran et al., 2007), la administración de fármacos (Palomba et al., 2008), la ovariectomización prolongada (Espinosa-Raya et al., 2012; Gibbs et al., 2006), el estrés oxidativo (Farfán-García et al., 2014; Pinto-Almazán et al., 2014) y el envejecimiento (de Aguiar et al., 2008). Además, la tibolona se ha propuesto como modulador endocrino (Genazzani et al., 2006) y regulador de neurotransmisores (Espinosa-Raya et al., 2012; Pinto-Almazán et al., 2017).

Puntualmente la tibolona, tiene un papel positivo en tres objetivos terapéuticos en el tratamiento de patologías neurodegenerativas: potenciación sináptica, disminución de la neuroinflamación y modulación de la gliosis reactiva (Del Río et al., 2020). Además, la tibolona aumenta la expresión de neuroglobina y disminuye los niveles de estrés oxidativo en el cerebro (Avila-Rodriguez et al., 2016). Disminuye la fosforilación de la proteína tau en machos y hembras cuando se utiliza en modelos animales (Neri-Gómez et al., 2017; Pinto-Almazan et al., 2018). Además, al tener en cuenta los efectos beneficiosos observados en ratas macho, la tibolona podría usarse tanto en hombres como en mujeres (Del Río et al., 2020). Sin embargo, existen marcadas diferencias sexuales en la expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de la tibolona (Alnouti and Klaassen, 2011; Del Río et al., 2020), aunque no existen estudios que consideren posibles diferencias sexuales en la metabolización de la tibolona (Del Río et al., 2020).

Por otra parte, uno de los efectos reportados al estudiar la menopausia es que la memoria se puede ver afectada y se han hecho varios estudios para observar los efectos de la tibolona sobre la memoria y cognición (Pinto-Almazán et al., 2017). Uno de eso es el estudio de Albertazzi et al., (2000) informó que las mujeres posmenopáusicas tratadas con tibolona por 6 meses, mostraron mejoras en la memoria semántica a largo plazo de manera similar a mujeres que reciben el fármaco Kliogest (estradiol y un progestágeno (noretisterona acetato)) (Albertazzi et al., 2000). Este efecto podría ser explicado porque la tibolona disminuye la globulina fijadora de hormonas sexuales, y esto podría aumentar la biodisponibilidad de estrógeno y testosterona (Hofling et al., 2005; Pinto-

Almazán et al., 2017). Lo anterior se corrobora con otro estudio observando los efectos cognitivos de la terapia de remplazo hormonal con una duración de 10 años, mostrando mejorías en memorias semántica, pero no hubo cambios en la memoria episódica, no obstante, entre los fármacos estudiados tibolona fue la que mostró peor desempeño en atención sostenida y tareas de planificación (Fluck et al., 2002; Pinto-Almazán et al., 2017).

El tratamiento con tibolona en ratas ovariectomizadas jóvenes, adultas y ancianas, mejoró la memoria en una prueba de evitación pasiva de tipo reductor (Aguiar et al., 2006). En un modelo de menopausia, se evidenció que dosis de tibolona entre 1 y 10 mg/kg mejoraron el aprendizaje aumentando las latencias del laberinto en forma de T en comparación con el grupo que recibió únicamente el vehículo (de Aguiar et al., 2008). Se ha reportado que en ratas adultas ovariectomizadas el tratamiento con tibolona usando 0.5 mg/kg, disminuyó significativamente el contenido de proteína tau hiperfosforilada y aumentó la cantidad tau defosforilada. Estos se relacionan con el aumento de la fosforilación de GSK3 en el hipocampo y el cerebelo. Sugiriendo indican que la tibolona puede modular la fosforilación de tau y, lo cual puede ayudar determinadas tauopatías, como el Alzheimer (Guerra-Araiza et al., 2007; Pinto-Almazán et al., 2012). Otro estudio informó que en un modelo de estrés oxidativo en roedores, se observaron efectos neuroprotectores de la tibolona con una dosis de 1 mg/kg para reduciendo, el daño cognitivo, motor y la muerte neuronal en la región CA3 del hipocampo (Farfán-García et al., 2014; Pinto-Almazán et al., 2017).

En ratas jóvenes ovariectomizadas se observó que la tibolona redujo los niveles de peroxidación lipídica en el hipocampo (de Aguiar et al., 2008). Cabe mencionar que la ovariectomización no es un modelo adecuado para evaluar estrés oxidativo ya que no se observaron cambios importantes alrededor del estrés. Sin embargo, se encontraron efectos benéficos con los tratamientos tibolona. (Pinto-Almazán et al., 2017). No obstante, se ha reportado en un modelo de estrés oxidativo, que el tratamiento con tibolona (1 mg / kg / día) antes de la exposición crónica al ozono previno el aumento de marcadores de estrés oxidativo como 4-hidroxinonenal y nitro tirosina (Pinto-Almazán et al., 2014), específicamente en la región CA3 del hipocampo (Farfán-García et al., 2014; Pinto-Almazán et al., 2017).

Por otra parte, la tibolona ha mostrado efectos protectores en diferentes células del cerebro, como en células de microglía sometidas a un insulto lipotóxico con pal, reduciendo la muerte celular, y

la producción de ROS y la respuesta inflamatoria (Hidalgo-Lanussa et al., 2018). También, se ha reportado que la tibolona protege contra la privación de glucosa en un modelo de glioblastoma de astrocitos humanos (células T98G) (Ávila Rodriguez et al., 2014). Similarmente, tibolona ha protegido las células T98G en un modelo de lipotoxicidad por pal, reduciendo la muerte celular, reduciendo la expresión incrementada de TERT, evitando la perdida de potencial de membrana mitocondrial y de la cardiolipina y reduciendo genes de respuesta inflamatoria como IL-6, IL-1B (González-Giraldo et al., 2018, 2019). Adicionalmente, con astrocitos humanos normales sometidos a pal $2\mu M$, se reportó que la tibolona $10nM$, redujo la muerte celular, producción de superóxido, perdida de cardiolipina y la fragmentación nuclear (Martin-Jiménez et al., 2020). Además, se ha evidenciado como los metabolitos de tibolona activan los receptores de estrógeno alfa y beta en astrocitos humanos (Guzmán et al., 2007). Los diferentes estudios sugieren que la tibolona podría mediar efectos protectores en algunas de las células previamente mencionadas. No obstante, es necesario realizar más estudios para determinar si la tibolona tiene efectos sobre la neuroinflamación, y la astrogliosis reactiva (Acaz-Fonseca et al., 2016; Pinto-Almazán et al., 2017).

Teniendo en cuenta la evidencia discutida, la tibolona se puede considerar como un fármaco adecuado para la terapia de reemplazo hormonal en pacientes peri menopáusicas y como un agente neuroprotector prometedor (Del Río et al., 2020). En este sentido, dado que la terapia con esteroides neuroactivos ha allanado el camino para mejorar los resultados clínicos en enfermedades neurodegenerativas (Vegeto et al., 2020) como la EA y la EP (Reddy and Estes, 2016), el accidente cerebrovascular (Andrabi et al., 2017) y los trastornos psiquiátricos como los síntomas depresivos y psicóticos (Weiser et al., 2019). Por lo anterior, más estudios deberían considerar el uso de la tibolona como un agente terapéutico, que no se centre únicamente en la terapia de reemplazo hormonal sino que la aborde como un agente neuroprotector (Del Río et al., 2020).

6.7. Proteómica

La proteómica se basa en la separación, identificación y cuantificación de proteínas, así como sus interacciones y sus relaciones (Joshi & Patil, 2017), el término proteómica fue acuñado en 1994 por Marc Wilkins, refiriéndose “al complemento proteínico del genoma”, pero su definición puede variar desde “análisis de proteomas a gran escala” hasta “análisis simultáneos de todas las proteínas

en la célula" (Parker et al., 2010). Para llevar a cabo varios métodos es necesario separar las proteínas, esto se puede realizar mediante diferentes métodos como la electroforesis bidimensional (2-DE) (Cho, 2007; Mishra, 2010), este método consiste en la separación de proteínas por el punto isoeléctrico y luego en el gel por la masa molecular, esta técnica se ha mejorado con la inclusión de gradientes de pH obteniendo una mayor resolución (O'Farrell, 1975). Sin embargo, el método tradicional no puede identificar proteínas desnaturizadas de 10 a 200 kDa, así como proteínas con un peso <10 kDa o proteínas con concentraciones bajas, por lo que se han desarrollado plataformas para mejorar la tecnología 2-DE permitiendo la separación de este tipo de proteína se utilizó con un método como la electroforesis en gel de diferencia de fluorescencia bidimensional (DIGE), que reduce las variaciones de gel a gel utilizando marcadores fluorescentes de cianina, tiene más resolución y también permite cuantificaciones (Joshi & Patil, 2017). Otro método para la separación es la cromatografía, la cual consiste en el paso de péptidos o proteínas por una solución en un solvente apropiado sobre una matriz sólida, la cromatografía se clasifica dependiendo del tipo de matriz utilizada como cromatografía líquida o columna, cromatografía en el papel, cromatografía en gel fino y cromatografía de gases, el tipo de cromatografía más relevante para los estudios de proteómica es la cromatografía líquida que es la más adecuada para espectrometría de masas, pero también ha mejorado a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) al aumentar la presión en el columna y cambiar por esferas más pequeñas dando al método una resolución mejorada (Mishra, 2010).

Luego de la separación, se realiza la identificación de proteínas, siendo la degradación de Edman el primer método que se desarrolló basándose en la identificación de un aminoácido a la vez desde el extremo N-terminal del péptido, el primer aminoácido N-terminal se hace reaccionar con fenil-isotiocianato, luego el aminoácido N-terminal se separa por hidrólisis como un complejo cíclico del aminoácido N-terminal llamado fenilhidronio dejando intacto el péptido acortado (Mishra, 2010). Con el tiempo han surgido otros métodos, como la espectrometría de masas y microarrays para proteínas o proteoarrays, esta configuración proporciona una plataforma para realizar un análisis robusto de muchas muestras de proteínas, esta tecnología permite detectar niveles bajos de proteínas y se utilizan para estudiar la bioquímica actividades de un proteoma completo en un solo experimento, así como interacciones proteína-ADN, proteína-proteína y otras, algunas de ellas utilizan anticuerpos para atrapar un conjunto de proteínas elegidas por el investigador (Cho et al., 2008; Joshi and Patil, 2017a).

La espectrometría de masas funciona según el principio de que las moléculas pueden ionizarse y, por lo tanto, pueden separarse en función de su relación masa-carga (m/z), el espectrómetro de masas (ms) se compone de una fuente de ionización, un analizador y un detector; la fuente debe poder producir iones, el analizador debe poder separar estos iones de acuerdo con su relación masa-carga y el detector debe tener la capacidad de detectar partículas cargadas y luego amplificar la respuesta para dar una señal medible (Parker et al., 2010). Una de las fuentes de ionización es el láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI), la ionización de MALDI utiliza un láser que golpea la muestra sólida hasta que captura la energía del láser y luego se rompe en pequeños pedazos liberándolos como iones desprendidos con carga baja y en ese momento las moléculas son aceleradas por un campo eléctrico que registra su tiempo de vuelo (TOF) siendo llamado MALDI-TOF (Cho et al., 2008). Posteriormente, generaron la desorción/ionización láser mejorada en la superficie (SELDI-TOF), la cual es una actualización de MALDI-TOF que permite procesar muestras complejas (Gomes-Alves et al., 2010).

Por otra parte, existen diferentes técnicas, como la ionización por electrospray (ESI) que consiste en una ionización en fase líquida de la muestra mediante el uso de un campo electromagnético formando pequeñas gotas cargadas y que se liberan como un aerosol, cuando el solvente empieza a evaporarse de las gotitas las proteínas quedan desprendidas en el medio, a medida que las moléculas se cargan positivamente, la relación masa/carga es suficiente para analizar la muestra mediante ms (Cho, 2007; Joshi and Patil, 2017b). Posteriormente se desarrolló otro diseño usando una trampa de iones lineales (LIT), un espectrómetro de masas con ESI y MALDI denominado MALDI-LIT-ESI, este diseño permite utilizar en la misma muestra dos fuentes de iones independientes/canales ópticos de iones conectados en extremos opuestos de un único analizador de masas permitiendo al sistema la introducción simultánea de iones de doble canal, análisis y comutación electrónica de alto ciclo de trabajo (<1 s) entre canales iónicos (Cho, 2007; Joshi and Patil, 2017a; Smith et al., 2007).

Los métodos proteómicos cuantitativos basados en ms se dividen en 3 grupos diferentes: 1. marcaje químico/enzimático; 2. marcaje metabólico y 3. sin marcaje o label-free (Tabla 2) (Chen et al., 2015). Los métodos de marcaje químico/enzimático introducen el marcaje de masa en las proteínas o péptidos y se realizan *in vitro*, el marcaje metabólico también etiqueta la proteína o los péptidos,

pero se usan *in vivo* o *ex vivo*, y label-free en cambio no necesita ningún tipo de marcaje (Chen et al., 2015).

El marcaje químico consta de: etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT) que utilizan un enlazador pesado con deuterio y un enlazador ligero para diferenciar las muestras y obtener una cuantificación relativa a través de ms (Han et al., 2001; Shio and Aebersold, 2006), etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) (Choe et al., 2007; Philip L. Ross‡, 2004), etiquetas de masa en tandem (TMT) (Thompson et al., 2003), marcaje de di metilo que ha sido utilizado con espectrometría de masas LTQ para estudiar el cáncer en el hígado (Boersema et al., 2009; Hsu et al., 2003; TANG et al., 2013), y un ejemplo de marcaje enzimático es el marcaje de ¹⁸O que tiene las mismas bases pero en lugar de usar un marcador químico marcan con la acción de una enzima cambiando el peso molecular en una de las muestras del oxígeno a 18 y en la otra muestra a 16 por lo que el espectrómetro de masas es capaz de distinguir la precedencia de los péptidos o proteínas (Miyagi and Sekhar Rao, 2006).

Los métodos de marcaje metabólico en su lugar utilizan la incorporación biológica de marcadores de isótopos estables en proteínas en cultivos de células vivas, incluido el marcaje de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular (SILAC) con diferentes pesos ligero, medio o pesado, este método se utiliza para obtener el proteoma pero algunas variantes como el SILAC pulsado se utiliza para obtener proteínas sintetizadas *de Novo*, también SILAC se ha usado para caracterizar cambios en diferentes muestras, para distinguir proteínas específicas que interactúan en las redes de interacción proteína-proteína, y para analizar el recambio de proteínas celulares en la escala de todo el proteoma (Chen et al., 2015; Ong et al., 2002; Zhang et al., 2016).

Por otra parte, El marcaje ¹⁵N cambia el peso de cada nitrógeno de 14 a 15 en una muestra y en la otra es normal para diferenciar las muestras, este método se usa normalmente en organismos modelo multicelulares (Gouw et al., 2010; Krijgsveld et al., 2003). El Bio-ortogonal Non Canonical Amino acid Taging (BONCAT) se utiliza para investigar proteomas sintetizados *de Novo*, en el primer paso de BONCAT, las proteínas recién sintetizadas se marcan utilizando el aminoácido transportador artificial azidohomoalanine (AHA) o el aminoácido que lleva alófono Homopropargilglicina (HPG) como sustituto de la metionina, dando a las proteínas una nueva funcionalidad de azida o alquino con la reacción de marcado de azida-alquino de cobre catalizado que formará una etiqueta de afinidad portadora que se unirá a los aminoácidos de la muestra que

sirve para distinguir sacarlos de la reserva de proteínas preexistentes (Glenn et al., 2017; Landgraf et al., 2015). Y el método BONLAC se desarrolló a partir de la fusión de SILAC + BONCAT, que se utiliza para obtener el proteoma de cortes de tejido y marcar proteínas sintetizadas *de Novo* (Bowling et al., 2016).

Mientras tanto, los métodos sin marcaje o label-free se comparan sin marcar las proteínas o péptidos, pero midiendo los cambios de intensidad de los iones en la cromatografía o contando el número de espectros de fragmentos que identifican los péptidos de una proteína determinada (Chen et al., 2015), normalmente estos métodos utilizan ESI acoplados a LC o HPLC y ms, tienen menor resolución pero son más fáciles de ejecutar y son rápidos, además de tener capacidad para más muestras (Tabla 2) (Syahir et al., 2015).

Tabla 2. Tabla de comparación de los diferentes métodos de proteómica

Métodos de cuantificación	Introducción del etiquetado	Nivel del etiquetado	Tipo de muestra	Numero de condiciones comparables	Precisión de la cuantificación	Cobertura del proteoma cuantitativo
Etiquetado metabólico						
Silac	<i>ex vivo, in vivo</i>	Proteínas	Células, tejidos o animales	hasta 5	+++	++
15N	<i>ex vivo, in vivo</i>	Proteínas	Células	2	+++	++
Etiquetado químico						
ICAT	<i>in vitro</i>	Proteínas	Cualquier muestra	2	++	++
iTRAQ	<i>in vitro</i>	Péptidos	Cualquier muestra	hasta 4 o hasta 8	++	++
TMT	<i>in vitro</i>	Péptidos	Cualquier muestra	hasta 6 o hasta 10	++	++
Etiquetado con dimetil	<i>in vitro</i>	Péptidos	Cualquier muestra	3-Feb	++	++
Etiquetado enzimático						
18O	<i>in vitro</i>	Péptidos	Cualquier muestra	2	+	+++
Sin etiqueta o label-free						
Intensidad de iones	n.a	n.a	Cualquier muestra	Sin límites	+	+++
Conteo de espectros	n.a	n.a	Cualquier muestra	Sin límites	+	+++

Tabla modificada de (Chen et al., 2015). Tabla que consigna las diferencias clave de los diferentes métodos de marcaje de proteómica, en cuanto a la cantidad de muestras posibles a comparar, tipo de muestras, cobertura del proteoma y la precisión dada por cada método. Abreviaciones: (n.a = no aplica; + = bueno; ++ = muy bueno; +++ = excelente).

Algunas de las aplicaciones de la proteómica en neurociencias “Neuroproteómica” han sido el uso de BONLAC para determinar la síntesis *de Novo* de proteínas en cortes de cerebro de rata (Bowling et al., 2016), la caracterización del proteoma después de una lesión cerebral traumática que muestra los cambios en la expresión y vías alteradas principalmente las relacionadas con la supervivencia celular (Kobeissy et al., 2008), algunos otros estudios buscan biomarcadores para diferentes enfermedades como Ataxia-Telangiectasia caracterizando el proteoma de pacientes con esta enfermedad y obteniendo 13 proteínas que han sido fosforiladas y relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Collection et al., 2014).

En astrocitos, la proteómica se ha utilizado para determinar marcadores celulares como la proteína del ácido fibrilar glial (GFAP) (Yang et al., 2005), identificar el secretoma de los astrocitos (Dowell et al., 2009; Han et al., 2014), en tratamientos como aplicar BDNF a los astrocitos obtienen el proteoma y observaron la reducción de CX43 (Müller et al., 2015) y cambios en el proteoma en astrocitos presinápticos en el modelo de plasticidad sináptica inducida por miedo que muestra una reducción de la reducción de los transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 en los astrocitos 4 horas después del estímulo (Carney, 2014). También, se obtuvo el proteoma completo de las diferentes células de cerebros de ratón entre estas los astrocitos, usando métodos label-free (Sharma et al., 2015). Otro estudio uso ratones con bajo HFD y los trato con antioxidantes para reversar el daño causado por el exceso de grasas (Smine et al., 2017). La mayoría de los métodos se desarrollaron con proteómica label-free debido a que cada vez mejora su resolución y poder predictivo a medida que mejoran los espectrómetros de masas y con la combinación de métodos que usan el aprendizaje de maquina como la adquisición boxcar (Meier et al., 2018), o métodos como Prosit para la predicción de péptidos desde librerías construidas previamente para entrenar el algoritmo (Gessulat et al., 2019).

6.8. Biología de sistemas

De manera tradicional, al estudiar procesos biológicos se buscan mecanismos puntuales utilizando el método hipotético deductivo, generando una hipótesis que será confirmada o rechazada, al confrontarla con resultados experimentales, mientras que la biología de sistemas utiliza un enfoque basado en la modelización matemática de los procesos en estudio (Thiele et al., 2013). Como resultado de la simulación, se obtiene una serie de predicciones del estado de dicho proceso biológico que corresponderían a los resultados experimentales esperados (Lerman et al., 2012). Durante las simulaciones, la red de interacciones entre los elementos que componen el proceso biológico se representa mediante un sistema de ecuaciones diferenciales. Los valores de las características de dichos elementos a distintos tiempos y bajo las simulaciones de diferentes condiciones experimentales, se pueden predecir porque la dinámica del estado de ese sistema modelado es calculable matemáticamente (Wu et al., 2013).

El paradigma central de la biología de sistemas desde una aproximación mecanicista bottom-up se basa en la siguiente secuencia de eventos: se determinan los componentes, se hace la reconstrucción de redes, representación matemática de los modelos *in silico* y por último, mediante el uso de diferentes herramientas se hacen los estudios fisiológicos (Palsson, 2015; Thiele et al., 2013) que relaciona el genotipo con el fenotipo mediante la reconstrucción y el modelo *in silico* y se compone de cuatro pasos (Orth et al., 2010):

1. Midiendo los componentes biológicos, mediante la generación de datos proveniente de las diferentes ómicas y búsqueda de datos en la literatura sobre el organismo objetivo, con la finalidad de enumerar los componentes biológicos y los procesos de interés.
2. Reconstrucción de la red y la formulación de una reconstrucción bioquímica, genética y genómica del metabolismo basado en los conocimientos adquiridos previamente.
3. Conversión de la reconstrucción en un formato matemático y la aplicación de herramientas de análisis *in-silico*.

4. Usos prospectivos, Los modelos se utilizan para analizar, interpretar y predecir resultados experimentales. La predicción corresponde esencialmente a la generación de hipótesis específicas que pueden ser probadas experimentalmente (Orth et al., 2010; Palsson, 2015; Thiele et al., 2013)

Por otra parte, las tecnologías ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica) ha generado una gran cantidad de información sobre diferentes componentes celulares, procesos celulares y funciones moleculares (del Sol et al., 2010). Mediante la integración de estos datos de las ómicas generados de manera experimental, con herramientas computacionales, la biología de sistemas busca explicar y predecir comportamientos complejos de sistemas biológicos (Thiele and Palsson, 2010). En diferentes niveles (moléculas, células, organismos, poblaciones, ecosistemas), analizando las interacciones y/o asociaciones de los componentes totales del sistema, y sus propiedades emergentes, en vez de estudiar directamente las propiedades de los componentes individuales en sí mismos (Papin et al., 2005). Este enfoque facilita la representación, descripción y simulación de diferentes modelos como el de las enfermedades, visualizándolas como redes moleculares dinámicas alteradas (Schellenberger et al., 2010).

Al entender los entes biológicos desde una perspectiva de sistemas y redes, se pueden representar con nodos hechos de diferentes componentes como (genes, metabolitos, RNA, proteínas) y aristas unen los nodos, representando una relación que puede ser física, enzimática o funcional (Rozen et al., 2005). De esta forma, la estructura y topología de las redes obtenidas estarían moduladas por perturbaciones externas o ambientales e internas (cambios en la expresión de genes, mutaciones, expresión de proteínas, fosforilación de las mismas), y las propiedades específicas de la red determinarían el fenotipo (perturbadas o fisiológicas), las enfermedades se consideran como redes perturbadas (Feist et al., 2009). Además, clínicamente, los datos ómicos pueden brindar un panorama que permita plantear o proponer blancos terapéuticos y biomarcadores, subtipos de enfermedades, medicina personalizada, mecanismos de enfermedades e interacciones farmacológicas, conllevando a mejores diagnósticos y a nuevos candidatos farmacológicos (Kedaigle and Fraenkel, 2018; Schneider et al., 2012).

6.9. Procesamiento de datos a gran escala

Debido a que el volumen de datos generado por las diferentes ómicas es cada vez mayor, se ha vuelto indispensable, la implementación de métodos computacionales para la interpretación y

análisis de datos a gran escala (Patel-Murray et al., 2019). Por lo tanto se han desarrollado diversos métodos para reducir la dimensionalidad de grandes conjuntos de datos, agrupar y clasificar muestras o características basados en perfiles moleculares, correlacionando conjuntos de moléculas o fenotipos, que se encuentran biológicamente enriquecidos de una manera significativa, y comprender la conectividad y las dependencias de moléculas (Altaf-Ul-Amin et al., 2014; Kedaigle and Fraenkel, 2018; Parikshak et al., 2015; Prathipati and Mizuguchi, 2015; Wood et al., 2015). Estos métodos pueden ayudar definir las funciones de moléculas desconocidas detectadas por tecnologías ómicas, además de predecir y detectar proteínas o complejos que interactúan, analizar los cambios de secuencias o moléculas entre especies, integrar información a través de tipos de datos ómicos, determinar las moléculas más relevantes dentro del set de datos, encontrar biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades, o identificar objetivos farmacológicos (Altaf-Ul-Amin et al., 2014; Patel-Murray et al., 2019).

Los métodos para analizar datos de varias dimensiones provenientes de las ómicas, incluyen las aproximaciones de reducción de dimensionalidades y de correlación (Wood et al., 2015). La reducción de la dimensionalidad sirve para proyectar los datos multidimensionales en un número menor de dimensiones, reduciendo la complejidad de los datos, y facilitando la interpretabilidad y así clasificar o agrupar las muestras. Las técnicas más utilizadas incluyen el análisis de componentes principales y t-SNE (Giuliani, 2017; Oliveira et al., 2018). Otros enfoques de correlación, como el agrupamiento jerárquico y la regresión de mínimos cuadrados parciales, pueden evaluar las dependencias entre características o muestras de grupo y características en función de su similitud (Bourgeois and Kreeger, 2017; McLachlan et al., 2017; Si et al., 2014).

El análisis de vías, amplía los enfoques de correlación mediante el uso de conocimientos previos sobre la co-regulación genética (Wood et al., 2015). Para esto se usan bases de datos como Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Gene Ontology (GO), Reactome y WikiPathways las cuales relacionan genes y otras moléculas en función de sus conexiones mecánicas o relaciones funcionales (Ashburner et al., 2000; Carbon et al., 2019; Fabregat et al., 2018; Kanehisa et al., 2017; Slenter et al., 2018). Herramientas de enriquecimiento, como GOrilla e IMPALA, g:profiler, amiGO, metascape, utilizan estas bases de datos para realizar un enriquecimiento, dando un valor estadístico a los diferentes términos que se asocian un conjunto de moléculas (genes, proteínas o metabolitos) determinado (Eden et al., 2009; Kamburov et al., 2011; Patel-Murray et al., 2019).

Por otra parte, otra técnica más elaborada para modelar datos ómicos es el análisis de redes (Patel-Murray et al., 2019). Las redes regulación génica, las redes de interacción de proteínas y las redes bayesianas se pueden usar para identificar conexiones entre moléculas y visualizar las dependencias de estas en el set de datos (Wood et al., 2015). En algunos casos en estas redes es posible inferir la causalidad en redes no dirigidas (Patel-Murray et al., 2019). Adicionalmente, existen varias herramientas computacionales que permiten integrar diferentes capas ómicas, utilizando redes de interacción, la elección de la herramienta va a depender de los inputs disponibles, el interactoma de fondo y la pregunta biológica que se planea abordar, estas herramientas incluyen ANIMA, NetworKIN, MAGNETIC, PARADIGM, PathLinker, HotNet2, Hierarchical HotNet, PIUMet y Omics Integrator (Deffur et al., 2018; Linding et al., 2007; Patel-Murray et al., 2019; Pirhaji et al., 2016; Reyna et al., 2018; Ritz et al., 2016; Tuncbag et al., 2016; Vaske et al., 2010; Webber et al., 2018). En estas redes los vértices representan los vínculos potenciales entre los nodos, ponderados con probabilidades de interacción, mediante el uso de algoritmos de aprendizaje automático, como el algoritmo Prize Collecting Steiner Forest, que va a generar las subredes más relevantes para el set de datos ingresado y éstas servirán para priorizar las vías biológicas relacionadas a la pregunta de interés (Tuncbag et al., 2013). Dependiendo de los datos disponibles y del conocimiento previo, otros tipos de modelos pueden ser implementados. Cuando se conocen varios parámetros con anterioridad, se pueden construir modelos matemáticos utilizando ecuaciones diferenciales para proporcionar predicciones detalladas de la dinámica de un sistema (Simeoni et al., 2018). Sin embargo, la información sobre los parámetros generalmente se desconoce y el modelo suele incluir demasiadas variables (Patel-Murray et al., 2019). En este caso, los modelos lógicos se pueden utilizar para predecir el comportamiento de un sistema. Los modelos lógicos pueden proporcionar una buena aproximación de un sistema sin la necesidad de un gran espacio de parámetros (Patel-Murray et al., 2019; Wynn et al., 2012).

7. METODOLOGÍA

7.1. Cultivo celular

La línea celular de astrocitos humanos normales (NHA, Lonza CC-2565) se utilizó para este estudio debido a su similitud inherente con los astrocitos primarios en términos de morfología y

función. Las células NHA expresan GFAP (proteína de ácido fibrilar glial), un marcador clave de los astrocitos. Se cultivaron tres lotes diferentes de células NHA de diferentes donantes (# 0000612736, # 00005656712, # 0000514417) en medio ABM (Lonza) suplementado con suplementos SingleQuots (Lonza), los 3 lotes diferentes se tripsinizaron en el pase 3 y se colocaron en matraces de 25 cm² a una densidad de 10.000 células/cm², las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ a los 12 días, se cambió el medio ABM (Astrocytes basal medium) cada 2 días, según lo recomendado por Lonza hasta alcanzar una confluencia cercana al 80%, y luego se aplicaron los diferentes tratamientos.

7.2. Pretratamiento con Tibolona

Antes de cada experimento, los astrocitos se lavaron con PBS 1X y se privaron de suero, usando DMEM libre de rojo fenol (Lonza), sin suero, sin L-glutamina, y sin suplementos durante 6 h. Primero, se disolvió la tibolona (Sigma-Aldrich, T0827) en DMSO al 100% como una solución stock a 40 mM; se hicieron alícuotas para 3 usos máximo y se almacenaron a -20°C, posteriormente, de estas alícuotas se hicieron más diluciones con DMEM sin suero y sin rojo fenol. Siguiendo el protocolo establecido por Martin-Jiménez et al., (2020), el tiempo y la concentración del pretratamiento con tibolona usado en este estudio fue de 10 nM durante 24 h con una concentración de DMSO = 0.000025%.

7.3. Daño lipotóxico con ácido palmítico

Las células NHA se lavaron con PBS 1X y luego se trajeron con una solución de DMEM libre de rojo fenol, sin suero la cual contenía el ácido palmítico (Sigma), BSA (albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos; Sigma A2153) como proteína transportadora y carnitina (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) para transportar a él ácido palmítico dentro de la matriz mitocondrial. Las células se trajeron basados en los resultados previos obtenidos por Martin-Jiménez et al., (2020), los cuales indicaron que la concentración óptima de pal fue 2 mM diluido en BSA al 1.35% durante 24 h. El grupo de control incluyó 1.35% de BSA y carnitina 2 mM (Martin-Jiménez et al., 2020).

7.4. Extracción y cuantificación de proteínas

El protocolo definido para la extracción de proteínas utilizó la siguiente preparación para 1 ml de buffer de lisis compuesto por 720 ml de tampón RIPA, Lonza: 10 ml de fluoruro de sodio 10 mM; 10 ml inhibidores de proteasas Halt cocktail Thermo; 250 ml de pirofosfato 2,5 mM; 10 ml de ortovanadato 1mM. Se retiró el medio, se lavó el matraz con 1ml de PBS 1X frío y luego se extrajo el PBS con una pipeta, se añadió 72ml para un matraz de 25cm² del cóctel RIPA + inhibidores de proteasa, y se dejó 10 minutos en el congelador a -4 ° C, luego se raspó toda la superficie y se recogió en un Eppendorf. En este punto, los tubos Eppendorf se colocaron en hielo durante 30 min y se agitaron con vórtex durante 10 a 15 segundos cada 10 min. Después de los 30 minutos se centrifugó a 15200 rpm y -4 ° C durante 13 min, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se congeló a -80 ° C. La cantidad de proteína por muestra se cuantificó mediante el método de ensayo de ácido bicinconínico (BCA) con el kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.5. Digestión de proteínas y carga de las muestras al espectrómetro de masas Q-exactive

A continuación, el sedimento de proteína se solubilizó en 200 µL de urea 6 M y se envió al UC Davis Proteomics Core. Para la digestión, se añadieron 200 mM de ditiotreitol (DTT) hasta una concentración final de 5 mM y las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C. A continuación, se añadió yodoacetamida (IAA) 20 mM hasta una concentración final de 15 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de la adición de 20 µL de DTT para desactivar el IAA. Se añadió Lys-c a la muestra y se incubó durante 2 horas a 30°C. Después, las muestras se diluyeron hasta > 1 M de urea mediante la adición de AMBIC 50 mM y se añadió tripsina y las muestras se digirieron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las muestras se desalaron usando la Columna Macro Spin (Grupo Nest).

Los péptidos digeridos se analizaron mediante LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap junto con HPLC Proxeon Easy-nLC II (Thermo Scientific) y una fuente de nanospray Proxeon. Los péptidos digeridos se cargaron en una trampa de fase inversa Magic C18 100Å 5U de 100 micrones x 25 mm donde se desalaron en línea antes de separarse utilizando una columna de fase inversa Magic C18 200Å 3U de 75 micrones x 150 mm. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente de 180 minutos con un caudal de 300 nl/min. Se obtuvo

una exploración de encuesta de MS para el rango de m/z 300-1600, los espectros de MS/MS se adquirieron utilizando un método de los 15 principales, donde los 15 iones principales en los espectros de MS se sometieron a HCD (disociación por colisión de alta energía). Se utilizó una ventana de masa de aislamiento de 2,0 m/z para la selección de iones precursores y se utilizó una energía de colisión normalizada del 27% para la fragmentación. Se utilizó una duración de veintidós segundos para la exclusión dinámica.

7.6. Procesamiento de los archivos crudos para la identificación de proteínas

Los archivos se procesaron utilizando los siguientes parámetros, un máximo de escisión errónea de 2, en la identificación de precursores de iones un mínimo del 50%, la búsqueda de péptidos razor (compartidos entre diferentes muestras) y únicos; como base de datos se obtuvieron las proteínas validadas de SwissProt human y posteriormente se generó la cuantificación label-free con el software Proteome Discoverer 2.3 utilizando el motor de búsqueda Sequest y AMANDA. Además, los resultados se procesaron utilizando MaxQuant v1.6.10.43 y Perseus v 1.6.10.45 para comparar el número de proteínas válidas y péptidos identificados. determinando que los resultados con más proteínas y mejor agrupamiento de las muestras fueron resultados obtenidos con Proteome Discoverer 2.3 y Sequest.

Para la Normalización y estadística para la cuantificación relativa se importaron las intensidades de proteínas (no normalizadas) al entorno del software de programación estadística R versión 4.0.1 (R Core Team, 2020). Para el procesamiento y análisis estadístico, los datos se transformaron con (\log_2) para obtener una distribución más simétrica antes del análisis estadístico y se mantuvieron todas las proteínas con un 70% de valores válidos por grupo (que comprenden 6 réplicas en cada grupo) (Karpievitch et al., 2012). La normalización se realizó usando el método de Normalización de Estabilización de Varianza (VSN), uno de los métodos no lineales que tienen como objetivo mantener la varianza constante en todo el rango de datos y se acerca al logaritmo de valores grandes para eliminar la heterocedasticidad utilizando el seno hiperbólico inverso (Huber et al., 2002).

La imputación de los valores perdidos se realizó mediante K-Neighbor Imputation (KNN) tiene como objetivo identificar k características que son muy similares a las proteínas con valores perdidos, donde la similitud se estima mediante la medida de distancia euclídea, y los valores

perdidos se imputan con los valores del promedio ponderado de estas proteínas vecinas (Chai et al., 2014). Usando un valor de KNN de 10.

7.7. Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se realizó mediante el estadístico Prueba de reproducibilidad optimizada (ROTS), que clasifica las características según su expresión. ROTS es una prueba T modificada que tiene como objetivo eliminar el sesgo en los datos (Elo et al., 2008; Suomi et al., 2017). El tratamiento de tibolona junto a pal fue denominado como tip y se hicieron las siguientes comparaciones de las condiciones (pal/Vehículo; tip / Vehículo; tip/ pal).

Posteriormente, se calculó el valor de Q (q_value) con los métodos de pFDR, Benjamini Hochberg y Bootstrap. utilizando el paquete R q_value 2.18.0 Bioconductor <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/qvalue.html> Storey JD, Bass AJ, Dabney A, Robinson D (2019). qvalue: estimación del valor Q para el control de la tasa de descubrimiento falso. Versión del paquete R 2.18.0, <http://github.com/jdstorey/qvalue>. Y con un Fold change (FC) ≥ 1.5 que es equivalente a un Log2 FC (LFC) $\geq \pm 0.58$.

7.8. Análisis de enriquecimiento funcional

Siguiendo las recomendaciones hechas por Reimand et al., (2019), el análisis de enriquecimiento de conjuntos de proteínas se realizó utilizando g:profiler (Reimand et al., 2019), para buscar los 20 términos TOP filtrados por significancia de p_ajustado (p_adj) se estableció con Bonferroni p <0.05 de la relación de proteínas en los términos de Gene Ontology (GO) dando prioridad al proceso biológico (BP) y la función molecular (MF), las vías de KEGG, Reactome (Raudvere et al., 2019) y Human Protein Atlas HPA

7.9. Análisis de co-expresión de redes de proteínas

Para determinar las proteínas con más interacciones en el conjunto de datos, se construyó un análisis de redes de co-expresión que se realizó utilizando el paquete de análisis de red de

correlación ponderada (WGCNA) (<https://horvath.genetics.ucla.edu/html/CoexpressionNetwork/Rpackages / WGCNA />, V1.68), empleando las abundancias de proteínas normalizadas de todas las muestras, con un umbral suave de 9 ($\beta = 9$) y un tamaño de módulo mínimo de 20 (material suplementario 6). Se utilizó la correlación de Pearson en las abundancias de proteínas normalizadas. Luego, se evaluó la superposición de cada módulo con el tratamiento, y todas las proteínas expresadas diferencialmente pal y tip se evaluaron utilizando los valores p de la prueba exacta de Fisher corregidos por Bonferroni. Después de esto, se hizo la construcción de redes de interacción de proteína a proteínas (PPI) y la identificación de objetivos críticos o proteínas hub, utilizando el complemento MCODE de Cytoscape 3.8.0, se seleccionaron 4 clústeres en la red PPI, reduciendo la red de 355 nodos y 2657 aristas a 110 nodos y 856 aristas.

Finalmente, se hizo un intercepto entre esas proteínas hub con las proteínas expresadas diferencialmente con un $q_value < 0.05$ en cada comparación para determinar proteínas con alta relevancia en la red que estaba cambiando su expresión con alta confianza.

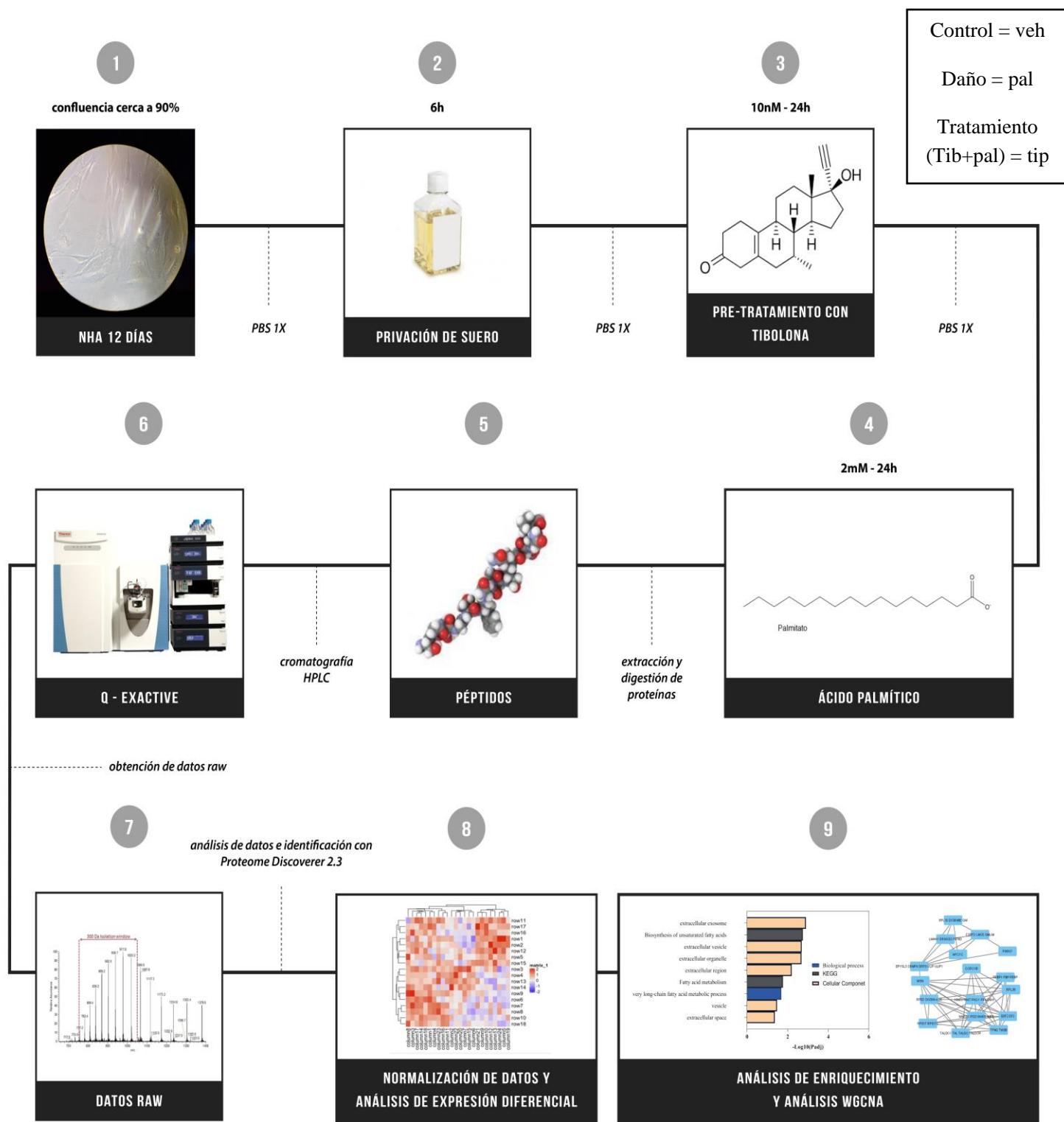


Figura 1. Figura resumen de la metodología seguida paso a paso seguidos en este estudio.

8. RESULTADOS

8.1 Perfilado proteómico de astrocitos expuestos al ácido palmítico

8.1.1 Identificación de proteínas y cuantificación relativa

Para investigar las alteraciones del proteoma asociadas con la lipotoxicidad inducida por pal en astrocitos se siguieron los procedimientos consignados en la (Fig. 1), analizando muestras de 3 réplicas biológicas diferentes de la línea celular NHA, denominadas como NHA1, NHA2 y NHA3, con 3 condiciones diferentes veh como control, pal como daño y tip como el pretratamiento con tibolona para reducir el daño generado por pal, adicionalmente se hizo una réplica técnica para cada muestra, para un total de 30 muestras.

Se realizó un perfil de expresión diferencial global de los astrocitos cultivados tras el tratamiento con pal. Identificando 10718 grupos de péptidos distintos, correspondientes a 1655 proteínas identificadas con alta confianza ($FDR < 0.01$). Debido a la naturaleza estocástica de la proteómica cuantitativa label-free o sin etiquetas de “escopeta”, pueden faltar datos de identificación o abundancia de proteínas en ciertas muestras (Karpievitch et al., 2012). Las proteínas con datos faltantes en cualquier muestra después de usar KNN se excluyeron de este análisis, lo que resultó en la cuantificación final de 1281 proteínas con datos completos en las 18 muestras y casos de control.

La abundancia de proteínas actúa como control de calidad, asegurando la cantidad de proteína en cada muestra sea similar y las diferencias observadas se deban a cambios por el tratamiento y no por cargar diferentes cantidades de proteínas, luego de la normalización, se observó que la abundancia de proteínas fue similar entre las diferentes condiciones y muestras utilizadas en el análisis (Fig. 2a). El mapa de calor ilustró una reproducibilidad general, así como la heterogeneidad individual de los perfiles de expresión de proteínas, agrupando las muestras más cercanas principalmente por el tratamiento usado en ellas y el segundo por las réplicas biológicas y el tratamiento usado en ellas (Fig. 2b).

Se generaron las listas de proteínas que fueron reguladas al alta y a la baja en cada comparación (Material suplementario 1, 2, 3). Entre pal_vs_veh y tip_vs_veh, se encontraron 31 proteínas

compartidas, todas con el mismo patrón de expresión excepto Q9UHB9 o la "subunidad de partículas de reconocimiento de señal SRP68" que cambió de una regulación a la baja en la comparación de pal_vs_veh a una regulación a al alta en tip_vs_veh (Fig. 5). Por otro lado, pal_vs_veh comparado con tip_vs_veh, mostró 13 proteínas únicas reguladas al alza y 10 reguladas a la baja, lo que sugiere que la tibolona devolvió esas 23 proteínas a niveles de expresión como la condición de control (Fig. 6) y esas proteínas se consignan en la (Tabla 4) y en su totalidad en el (Material suplementario 4).

8.1.2. Análisis de enriquecimiento funcional

Para comprender mejor los procesos afectados por el tratamiento con pal y tibolona, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con el fin de agrupar las proteínas en términos, con el fin de evaluar en un panorama más amplio los cambios en las células utilizando los términos más significativos en g:profiler que superan el umbral de valor de $p_{adj} < 0.05$. Comparando pal_vs_veh (Fig. 3 y 4), las proteínas reguladas a la baja se enriquecen para los siguientes términos, transporte intracelular $p_{adj} = 0.000116111$, establecimiento de localización en la célula, localización celular, inicio de la traducción $p_{adj} = 0.018303503$, transporte, procesamiento de proteínas en el RE $p_{adj} = 0.022648266$, transporte mediado por COPI, respuesta celular al estrés, respuesta celular a estímulos externos, transporte retrógrado de Golgi a RE $p_{adj} = 0.041526799$. Mientras tanto, las proteínas reguladas al alta enriquecieron para los siguientes términos, en GO componente celular (CC) principalmente al espacio extracelular y el término GO BP era proceso metabólico de AGs de cadena muy larga, y en términos de KEGG, metabolismo de AGs $p_{adj} = 0.017043077$ y biosíntesis de AGs insaturados $p_{adj} = 0.001779691$. Los resultados sugieren que pal está regulando a la baja el transporte de proteínas en la célula a diferentes regiones, particularmente se observa afectación en RE (Fig. 4). pal también está reduciendo el inicio de la traducción y está aumentando procesos relacionados a la biosíntesis de AGs y su transformación a moléculas más complejas. Entre las proteínas que regula al alta están la 3-ketoacyl-CoA tiolasa peroxisomal EC 2.3.1.16 (ACAA1); la enoil-CoA reductasa de cadena muy larga (TECR) y la proteína 1 de elongación de AGs de cadena muy larga (ELOVL1), las cuales enriquecen para el metabolismo de AGs de cadena muy larga $p_{adj} = 0.020697536$ y para el metabolismo de AGs $p_{adj} = 0.017043077$. Adicionalmente, al observar las proteínas compartidas entre las comparaciones tip_vs_veh y pal_vs_veh (Fig. 6 y Tabla 6) se encuentra que las proteínas reguladas a la baja

enriquecen a síntesis de AGs insaturados como ácido el alfa-linoleico, sugiriendo está reduciendo su síntesis. Esto, es relevante debido a que los AGs insaturados tienen efectos protectores en el cerebro, reduciendo inflamación y aumentando su supervivencia ante daño lipotóxico por pal (Bazinet and Layé, 2014; Bentsen, 2017; Tracey et al., 2018).

En la comparación de tip_vs_veh (Fig. 5), las proteínas reguladas a la baja se enriquecieron para términos relacionados con el transporte y la localización celular también redujo la respuesta de enfermedades infecciosas y enfermedades virales, y el proceso catabólico de ARNm: p_adj = 0.004026028, hidrólisis de GTP de la unidad ribosomal 60S p_adj = 0.009912779, proceso catabólico de macromoléculas celulares p_adj = 0.000940694. Sin embargo, la tibolona también incrementó las proteínas relacionadas con la localización de proteínas y celular p_adj = 5.26E-05 y 5.06E-06 respectivamente, el transporte de péptidos p_adj = 0.000445928 y el proceso efector inmune p_adj = 0.010693768. Por lo tanto, a nivel de enriquecimiento y en un panorama general de los cambios, se sugiere que el efecto protector de la tibolona probablemente esté relacionado con la regulación negativa de procesos que afectan la síntesis de proteínas y contrarrestan la desregulación causada en el transporte y la localización de proteínas, además de regular proteínas que se asocian a la respuesta inmune.

Los términos que se enriquecieron para tip_vs_pal (Fig. 7) proteínas reguladas a la baja son organelos extracelulares p_adj = 0.029179155, vesícula extracelular, exosoma extracelular, unión de cadherina p_adj = 0.042474795, corteza cerebral y células endoteliales p_adj = 0.026699216 y los términos para proteínas reguladas positivamente están relacionados con los componentes COPII capa de vesícula p_adj = 0.010432134, sitio de salida del RE p_adj = 0.045836963 y sorprendentemente con cáncer de tiroides p_adj = 0.029670923. Esto sugiere que las principales diferencias entre tip y pal están relacionadas con el transporte y las vesículas, sin embargo, el número de proteínas que mostraron expresión diferencial en esta comparación es pequeño, y eso podría explicar el enriquecimiento de términos inesperados como cáncer de tiroides, haciendo necesario inspeccionar el rol que juegan las proteínas de manera individual, una a una y no basarse únicamente en el análisis de enriquecimiento.

8.2 El ácido palmítico reduce las proteínas relacionadas con los procesos de transcripción y traducción

Son pocos los estudios centrados en la inducción de cambios producidos por pal en el proceso de la traducción de proteínas, y sus efectos en las células. A nivel de sistema nervioso no se encontró ninguno hasta la fecha, pero sí uno de los efectos de pal en la traducción de pal en macrófagos, sugiriendo que pal reduce el proceso de traducción de proteínas (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019). Similarmente, los resultados del presente estudio señalan que pal induce la expresión del factor de iniciación eucariota 2 α (eIF2 α), el cual, induce la represión de la traducción (He et al., 2018; Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019); en adición a lo anterior los resultados (Tabla 3) muestran que pal reguló negativamente la expresión de la subunidad 1 del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2S1) $p = 0.00418306$ y LFC = -1.14091479, esta proteína actúa en los primeros pasos de la síntesis de proteínas formando un complejo ternario con GTP y como un iniciador de la traducción ARN (Mikami et al., 2006), no obstante, también posee la capacidad dual de reprimir la traducción de proteínas (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019). Sin embargo, la fosforilación de eIF2 α no conduce necesariamente a la regulación a la baja de la traducción global (Boye and Grallert, 2020).

Entre otros procesos evidenciados, se encontró que pal reguló a la baja diferentes proteínas relacionadas con la traducción, como la proteína ribosómica 60S L37 (RPL37) $p = 0.00024395$ y LFC = -1.955268045, una proteína que pertenece a un segmento de la subunidad ribosómica 60S y la traducción de proteínas. Además, pal regula de forma negativa a la Importina-7 (IPO7) $p = 0.000647151$ y LFC = -1.4343906, una proteína encargada de transportar la proteína al núcleo (Gaudet et al., 2011), como las proteínas ribosómicas RPL23A, RPS7 y RPL5 (Jäkel and Görlich, 1998), histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Jäkel et al., 1999). Factor de transcripción y exportación de ARNm ENY2, factor de transcripción y exportación de ARNm (ENY2) $p = 0.000382123$ y LFC = -1.696939985, una proteína involucrada en la activación de la transcripción acoplada a la exportación de ARNm (Zhao et al., 2008), factor de inicio de la traducción eucariota 4 gamma 2 (eIF4G2) $p = 0.002612802$ y LFC = -2.91627833, una proteína relacionada con el inicio de la traducción, en adición Kar et al., (2013) reportó que la regulación a la baja de la expresión axonal de eIF4G2 también inhibía la síntesis de proteínas locales y el crecimiento de axones.

Una reducción de la transcripción puede dar como resultado una reducción de la traducción (Slobodin et al., 2017), la desregulación de proteínas relacionadas con la transcripción y la traducción sugiere un mecanismo, por el cual, la exposición a pal indirectamente puede conducir a estrés del RE, estrés oxidativo y respuestas inflamatorias debido a la desregulación de factores como eIF4 y eIF2 α y otras las proteínas relacionadas con el proceso de inicio de la traducción como la RPL37 e IPO7 que regula otras RPLs (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019; Liu and Qian, 2014). Lo que podría sustentar las diferentes vías de estrés en el mecanismo propuesto por Korbecki et al., (2019) en macrófagos tratados por pal, diciendo que la reducción de la traducción relacionada a eLF4 deriva en estrés del RE, inflamación y muerte celular (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019).

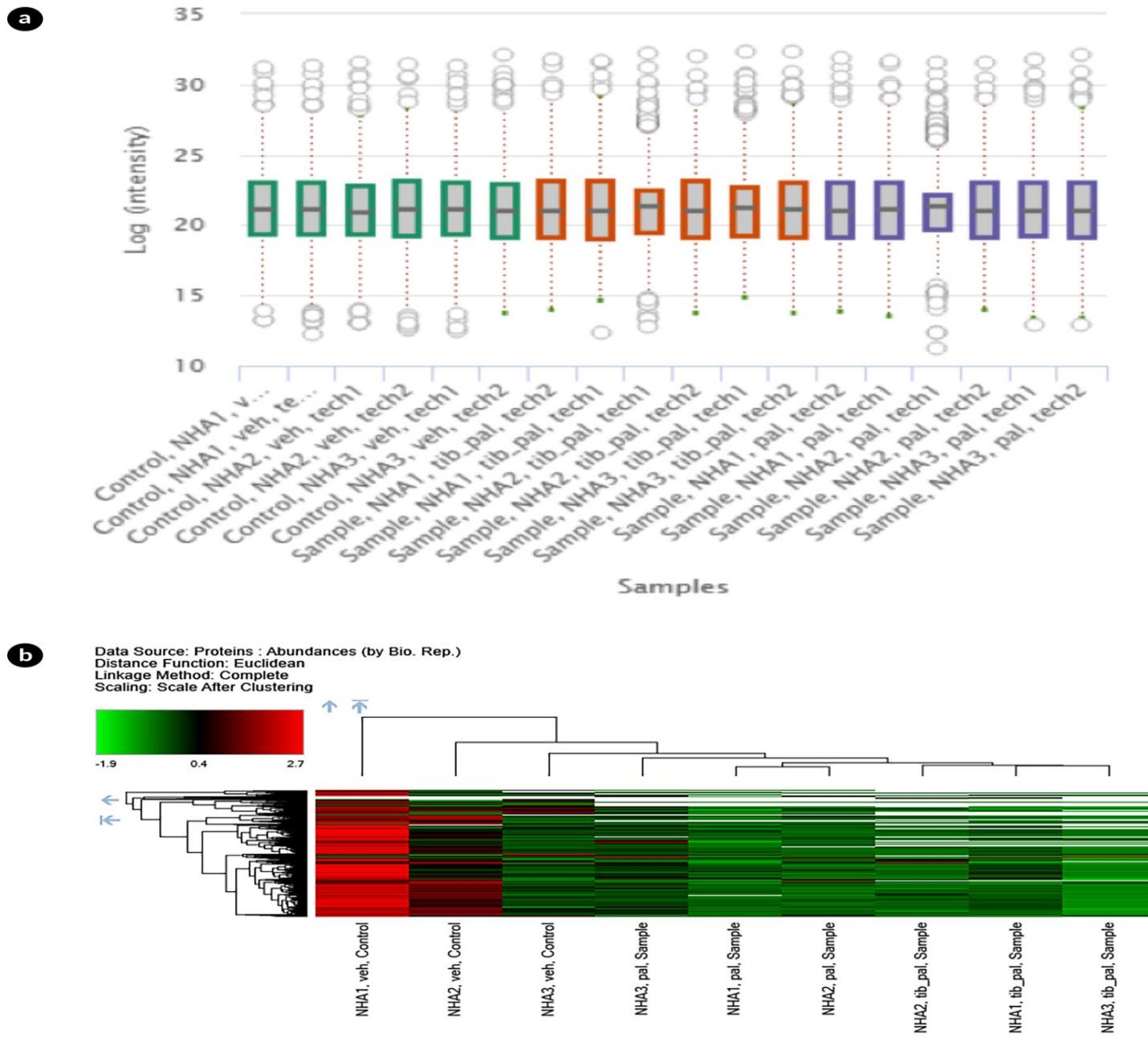


Figura 2. Abundancia de proteínas por muestra y replica biológica. a) Logaritmo de la intensidad, para observar la normalización por muestra después de usar el método de normalización VSN observando que todas las muestras tienen una media de intensidad similar b) Mapa de calor de la abundancia de proteínas agrupadas por replica biológica y el tratamiento, mostrando en rojo las abundancias relativas más altas y en verde las abundancias relativas más bajas.

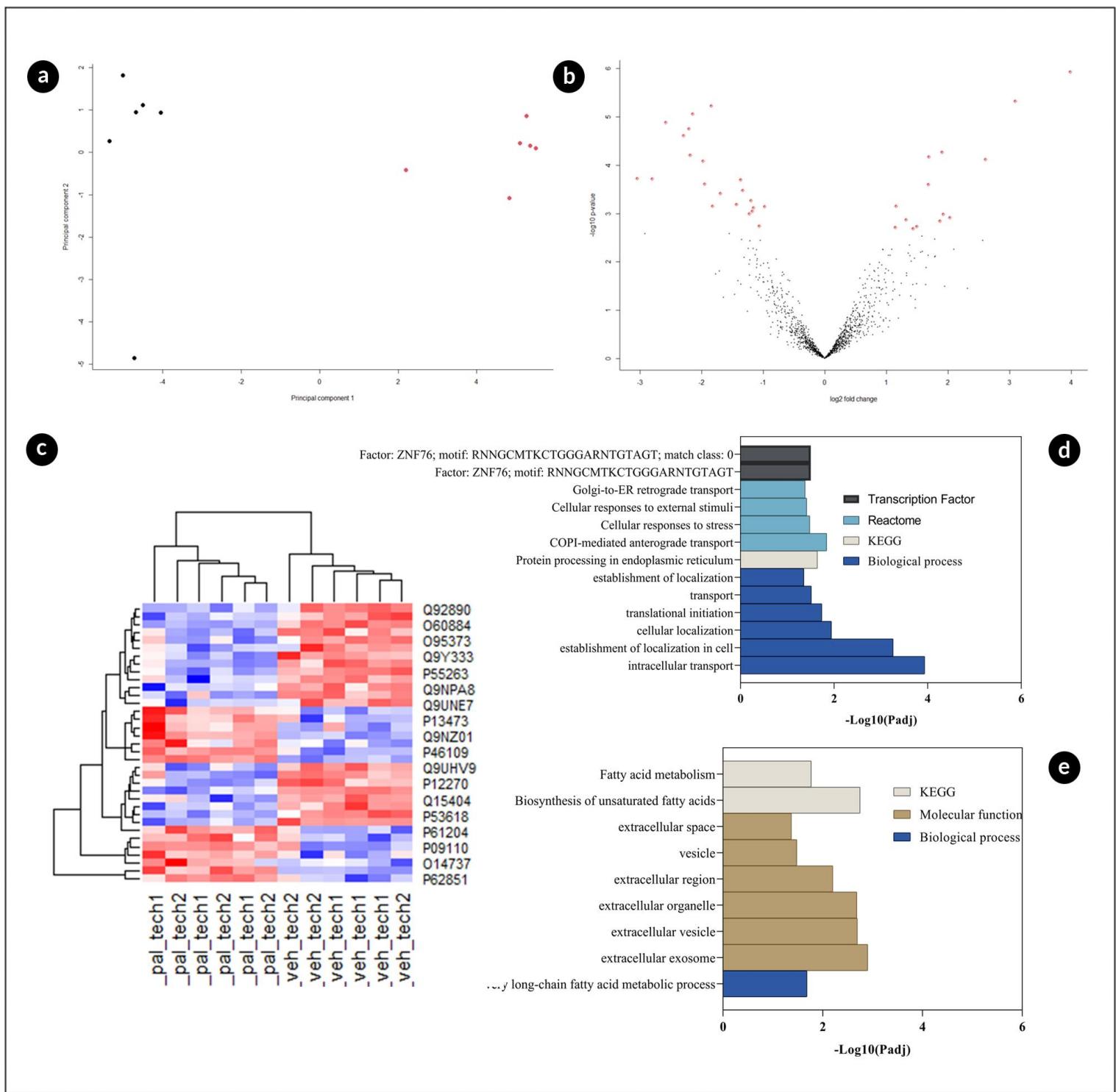


Figura 3. Expresión diferencial de pal_vs_veh. a) PCA de las muestras de pal en negro y veh en rojo; b) Gráfico de volcán que muestra proteínas expresadas diferencialmente con un valor de FDR <0.05; c) Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente proteínas con un FDR <0.05 en pal frente a veh; d) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas a la baja en pal frente a veh; e) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas al alta en pal frente a veh.

Tabla 3. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación de pal_vs_veh

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
P60484	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.48) (EC 3.1.3.67) (Mutated in multiple advanced cancers 1) (Phosphatase and tensin homolog)	PTEN MMAC1 TEP1	Al alta
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2) (Lysosome-associated membrane protein 2) (CD107 antigen-like family member B) (LGP-96) (CD antigen CD107b)	LAMP2	Al alta
O14737	Programmed cell death protein 5 (TF-1 cell apoptosis-related protein 19) (Protein TFAR19)	PDCD5 TFAR19	Al alta
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93) (Synaptic glycoprotein SC2) (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (TER)	TECR GPSN2 SC2	Al alta
Q9UJU6	Drebrin-like protein (Cervical SH3P7) (Cervical mucin-associated protein) (Drebrin-F) (HPK1-interacting protein of 55 kDa) (HIP-55) (SH3 domain-containing protein 7)	DBNL CMAP SH3P7 PP5423	Al alta
P09913	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT-2) (ISG-54 K) (Interferon-induced 54 kDa protein) (IFI-54K) (P54)	IFIT2 CIG-42 G10P2 IFI54 ISG54	Al alta
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5 OK/SW-cl.75	A la baja
P61927	60S ribosomal protein L37 (G1.16) (Large ribosomal subunit protein eL37)	RPL37	A la baja
O95373	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	IPO7 RANBP7	A la baja
Q92890	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) (UB fusion protein 1)	UFD1 UFD1L	A la baja
Q9NPA8	Transcription and mRNA export factor ENY2 (Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog)	ENY2 DC6	A la baja
P61313	60S ribosomal protein L15 (Large ribosomal subunit protein eL15)	RPL15 EC45 TCBAP0781	A la baja
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha)	EIF2S1 EIF2A	A la baja

Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP (EC 2.3.2.27) (Antigen NY-CO-7) (CLL-associated antigen KW-8) (Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) (RING-type E3 ubiquitin transferase CHIP) (STIP1 homology and U box-containing protein 1)	STUB1 CHIP PP1131	A la baja
Q92890	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) (UB fusion protein 1)	UFD1 UFD1L	A la baja

Lista de proteínas en las que se centró este estudio que fueron expresadas diferencialmente en la comparación de pal_vs_veh con un de FDR <0.1 y un p < 0.01.

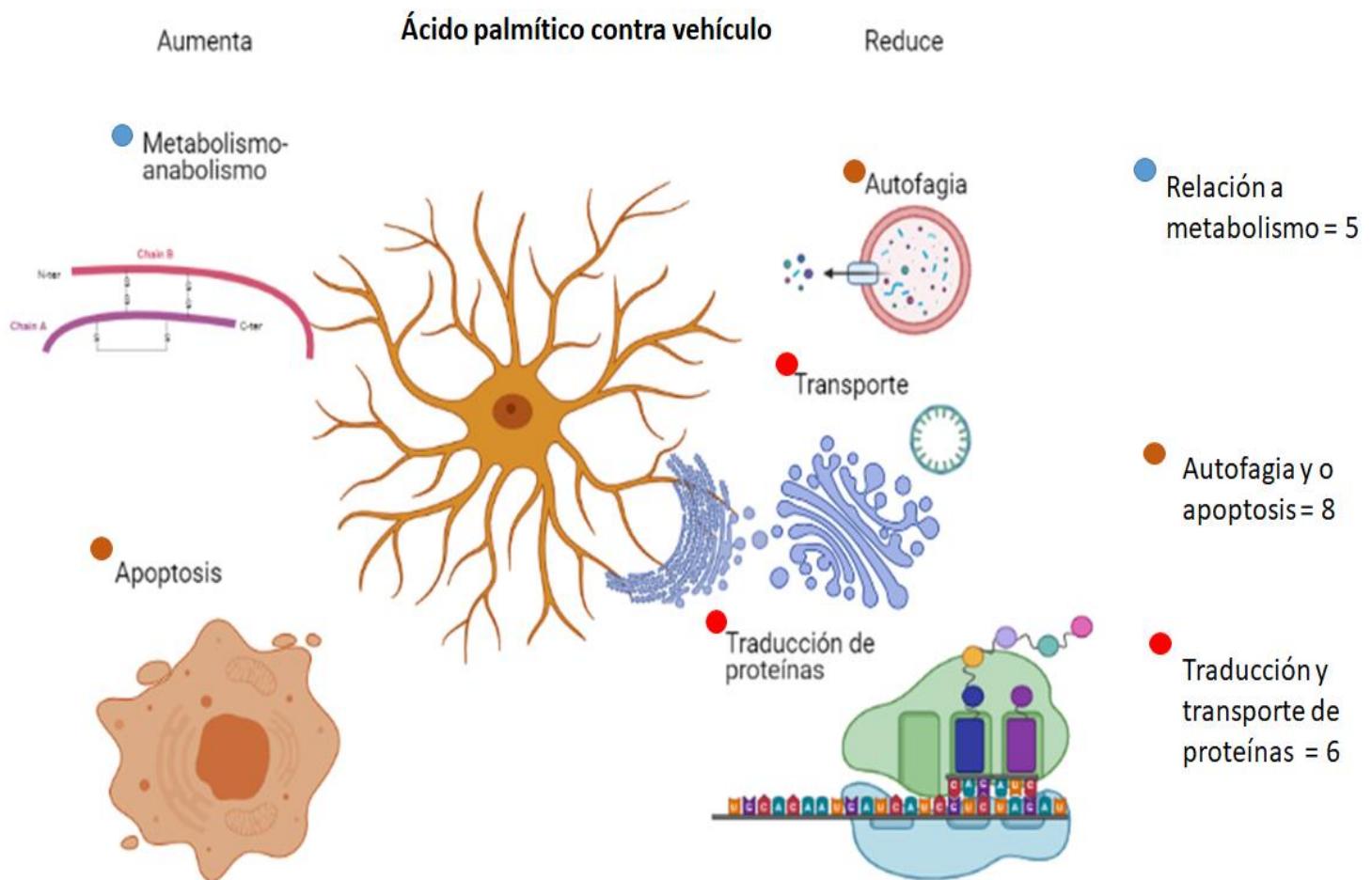


Figura 4. Proteínas expresadas diferencialmente por el ácido palmítico. Resumen de los procesos a los que se relacionan varias de las proteínas expresadas diferencialmente con un de FDR <0.1 y un p <0.01 en la comparación de pal_vs_veh.

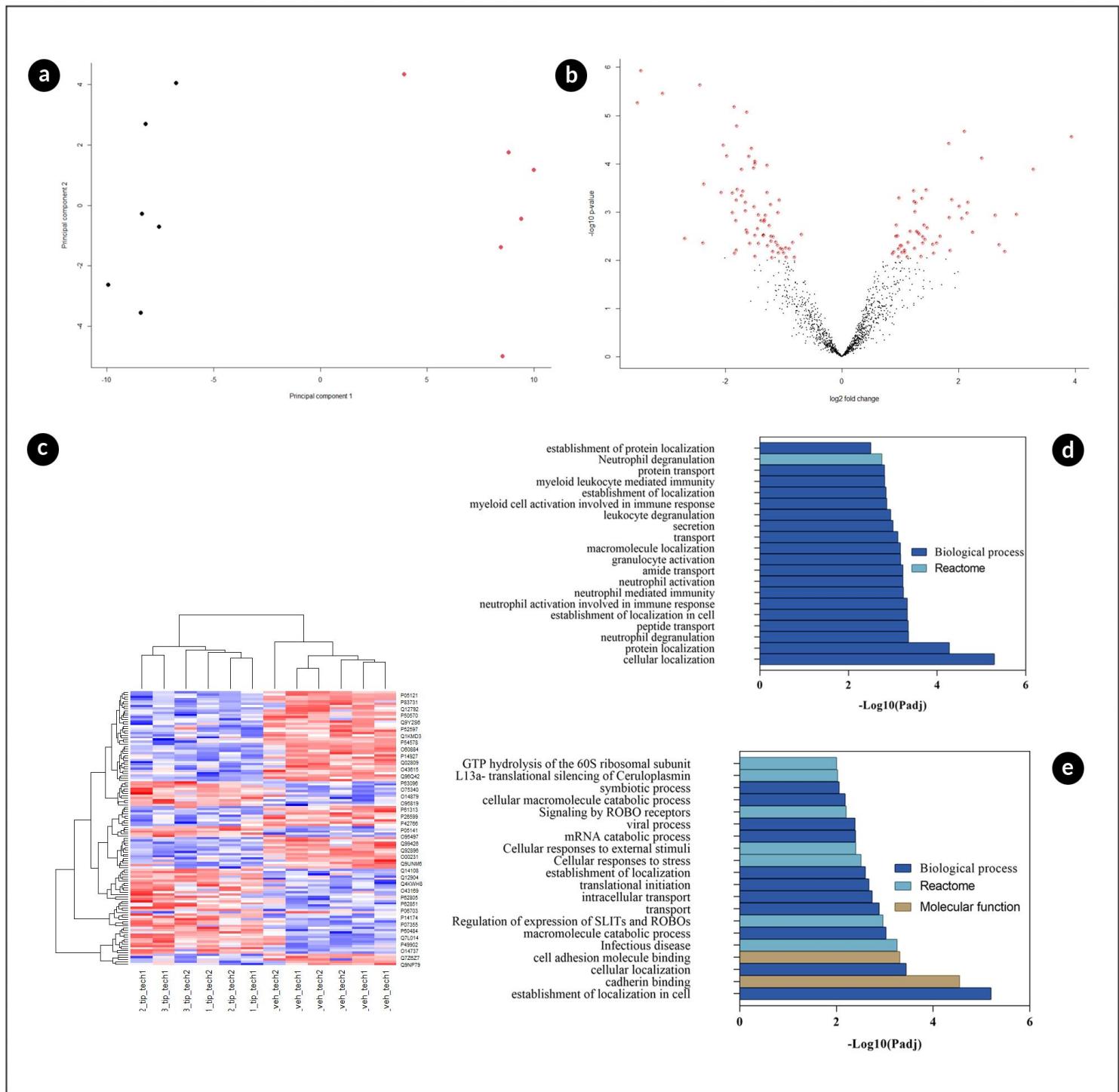


Figura 5. Expresión diferencial de tip_vs_veh. a) PCA de las muestras de tip en negro y veh en rojo; b) Gráfico de volcán que muestra proteínas expresadas diferencialmente con un valor de FDR <0.05; c) Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente proteínas con un FDR <0.05 en tip frente a veh; d) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas a la baja en tip frente a veh; e) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas al alta en tip frente a veh.

Tabla 4. Proteínas expresadas diferencialmente exclusivas de pal al comparar contra veh

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
P61204	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	Al alta
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2) (Lysosome-associated membrane protein 2) (CD107 antigen-like family member B) (LGP-96) (CD antigen CD107b)	LAMP2	Al alta
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (EC 7.1.1.2) (Complex I-51kD) (CI-51kD) (NADH dehydrogenase flavoprotein 1) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit)	NDUFV1 UQOR1	Al alta
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93) (Synaptic glycoprotein SC2) (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (TER)	TECR GPSN2 SC2	Al alta
Q9UJU6	Drebrin-like protein (Cervical SH3P7) (Cervical mucin-associated protein) (Drebrin-F) (HPK1-interacting protein of 55 kDa) (HIP-55) (SH3 domain-containing protein 7)	DBNL CMAP SH3P7 PP5423	Al alta
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5 OK/SW-cl.75	A la baja
Q9NPA8	Transcription and mRNA export factor ENY2 (Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog)	ENY2 DC6	A la baja
P61927	60S ribosomal protein L37 (G1.16) (Large ribosomal subunit protein eL37)	RPL37	A la baja
O95373	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	IPO7 RANBP7	A la baja
Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6 (Papillary thyroid carcinoma-encoded protein) (Protein H4)	CCDC6 D10S170 TST1	A la baja
Q13561	Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide) (Dynactin complex 50 kDa subunit) (DCTN-50) (p50 dynamitin)	DCTN2 DCTN50	A la baja
P53621	Coatomer subunit alpha (Alpha-coat protein) (Alpha-COP) (HEP-COP) (HEPCOP) [Cleaved into: Xenin (Xenopsin-related peptide); Proxenin]	COPA	A la baja

Lista de proteínas en las que se centró este estudio que fueron expresadas diferencialmente únicamente en pal al buscar dentro de las comparaciones de pal_vs_veh y tip_vs_veh con un de FDR <0.1 y un p <0.01.

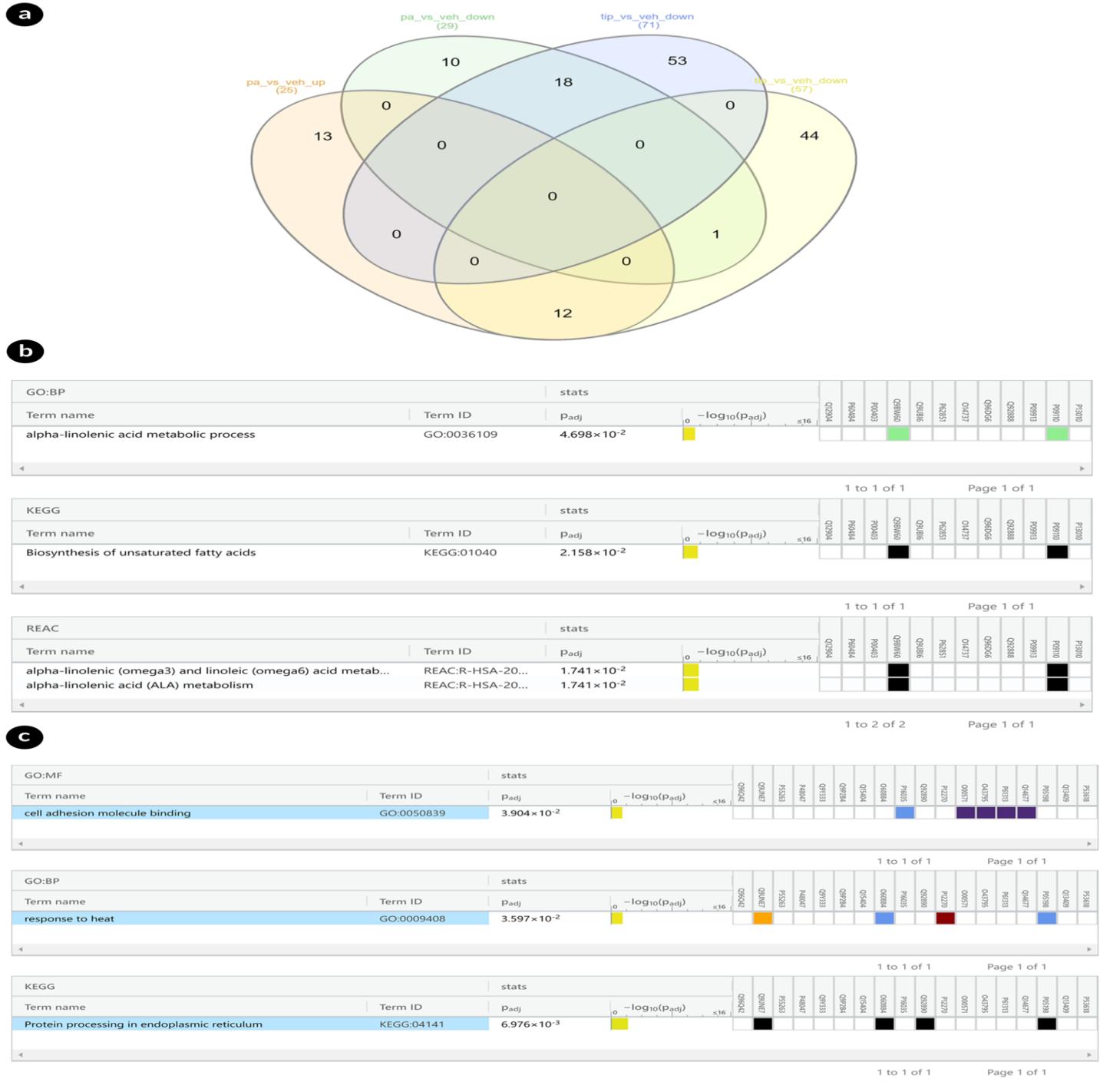


Figura 6. Proteínas únicas y compartidas entre tip_vs_veh y pal_vs_veh. a) Diagrama de Venn de pal y tip_vs_veh, para diferenciar las proteínas reguladas hacia arriba y hacia abajo en las diferentes condiciones en comparación con el vehículo. tip_vs_veh tiene 31 proteínas únicas que están reguladas al alta y 41 reguladas a la baja; pal_vs_veh tiene 9 proteínas reguladas al alta y 24 reguladas a la baja; entre las corporaciones, hay 5 compartidas reguladas al alta y 8 reguladas a la baja; b) Enriquecimiento funcional de proteínas compartidas que están reguladas a la baja; c) Enriquecimiento funcional de proteínas compartidas que están reguladas al alta.

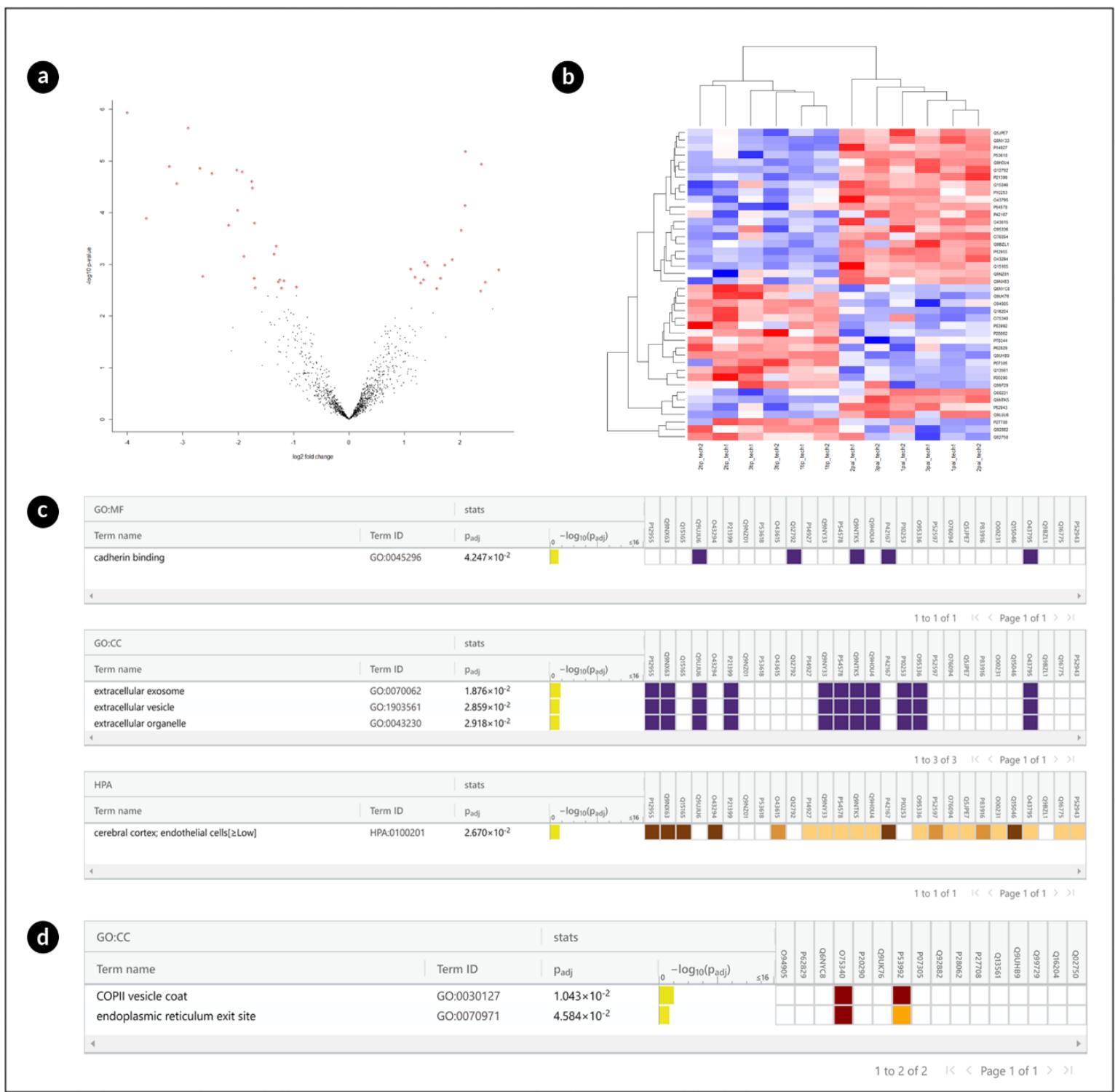


Figura 7. Expresión diferencial de tip_vs_pal. a) Gráfico de volcán que muestra proteínas expresadas diferencialmente con un valor de FDR <0.05 ; b) Mapa de calor de las proteínas expresadas diferencialmente proteínas con un FDR <0.05 en tip frente a pal; c) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas a la baja en tip frente a pal; d) Análisis de enriquecimiento de proteínas reguladas al alta en tip frente a pal.

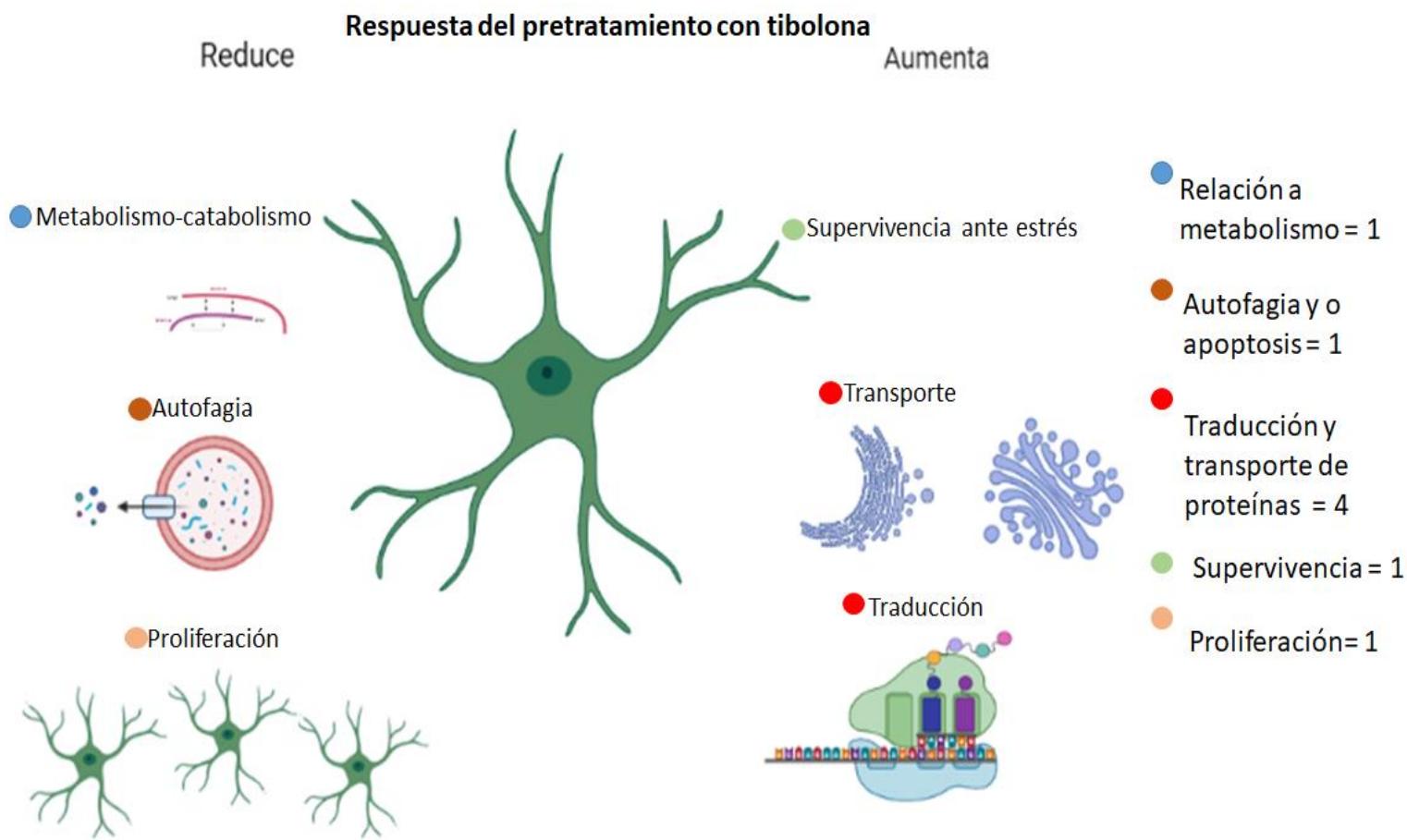


Figura 8. Proteínas reguladas por el pretratamiento con tibolona. Resumen de los procesos a los que se relacionan varias de las proteínas expresadas diferencialmente con un de FDR <0.1 y un p <0.01 en la comparación de tip_vs_pal.

Tabla 5. Proteínas expresadas diferencialmente en la comparación de tip_vs_pal

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
P62829	60S ribosomal protein L23 (60S ribosomal protein L17) (Large ribosomal subunit protein uL14)	RPL23	Al alta
O75340	Programmed cell death protein 6 (Apoptosis-linked gene 2 protein homolog) (ALG-2)	PDCD6 ALG2	Al alta
Q13561	Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide) (Dynactin complex 50 kDa subunit) (DCTN-50) (p50 dynamitin)	DCTN2 DCTN50	Al alta
Q9UHB9	Signal recognition particle subunit SRP68 (SRP68) (Signal recognition particle 68 kDa protein)	SRP68	Al alta
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5	Al alta

		OK/SW-cl.75	
Q02750	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP kinase kinase 1) (MAPKK 1) (MKK1) (EC 2.7.12.2) (ERK activator kinase 1) (MAPK/ERK kinase 1) (MEK 1)	MAP2K1 MEK1 PRKM1	Al alta
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3)	CHCHD3 MIC19 MINOS3	A la baja
O43294	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (Androgen receptor coactivator 55 kDa protein) (Androgen receptor-associated protein of 55 kDa) (Hydrogen peroxide-inducible clone 5 protein) (Hic-5)	TGFB1I1 ARA55	A la baja
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Ferritin repressor protein) (Iron regulatory protein 1) (IRP1) (Iron-responsive element-binding protein 1) (IRE-BP 1)	ACO1 IREB1	A la baja
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 14) (Ubiquitin thioesterase 14) (Ubiquitin-specific-processing protease 14)	USP14 TGT	A la baja
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20) (Acid maltase) (Aglucosidase alfa) [Cleaved into: 76 kDa lysosomal alpha-glucosidase; 70 kDa lysosomal alpha-glucosidase]	GAA	A la baja
Q76094	Signal recognition particle subunit SRP72 (SRP72) (Signal recognition particle 72 kDa protein)	SRP72	A la baja
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit (11; RPN6; S9)	PSMD11	A la baja

Lista de proteínas en las que se centró este estudio que fueron expresadas diferencialmente en la comparación de tip_vs_pal con un FDR <0.1 y un p<0.01.

8.3 El ácido palmítico afecta la autofagia y regula a la alta rutas proapoptóticas

Se sabe que pal induce muerte celular en astrocitos (González-Giraldo et al., 2018; Martin-Jiménez et al., 2020; Ng and Say, 2018), y se ha reportado que se relaciona con la reducción del proceso de autofagia (Ortiz-Rodriguez et al., 2018; Ortiz-Rodriguez and Arevalo, 2020). Por lo tanto, se investigaron los efectos de pal sobre la autofagia y la activación de vías proapoptóticas en astrocitos humanos. Observando cambios de expresión consistentes con esos efectos (Tabla 3). Encontrando

ubiquitina-proteína ligasa E3 fuertemente regulada al alta por pal CHIP (STUB1) $p = 0.000191257$ y LFC = -2.805049685, esta proteína tiene un rol fundamental en el proceso de plegamiento de proteínas dirigido a sustratos de chaperona mal plegados hacia la degradación proteosomal y probablemente induce la poli ubiquitinación que es necesaria para la degradación de proteínas (Shang et al., 2014). También cambio la expresión del factor de reconocimiento de ubiquitina en la proteína de degradación asociada a ER 1 (UFD1) $p = 0.000199063$ y LFC = -1.369768858 que es un componente clave para la vía proteolítica dependiente de ubiquitina para la degradación de proteínas mal plegadas (Gaudet et al., 2011). Además, pal regula al alza proteínas proapoptóticas como la proteína de muerte celular programada 5 (PDCD5) $p = 0.001415301$ y LFC = 1.864688494 y la proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopeptide 2 (IFIT2) $p = 0.003626464$ y LFC = 2.561125172. La regulación al alza de PDCD5 e IFIT2, combinada con la regulación a la baja de STUB1 y UFD1, sugieren un mecanismo por el cual la exposición al ácido palmítico puede conducir a una interrupción de la autofagia y la inducción de apoptosis. Sorprendentemente, a nivel de proteínas, el daño inducido por pal en las células NHA no estuvo fuertemente relacionado con el estrés oxidativo o con la respuesta inflamatoria. Sin embargo, muchas proteínas de pal están relacionadas con el término desgranulación de neutrófilos y esto podría indicar indirectamente que pal está produciendo inflamación.

8.4 La tibolona devuelve diferentes proteínas a niveles de expresión comparables a los del control.

Se compararon las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación entre pal y veh y la comparación de tip_vs_veh (Tabla 4), siguiendo la lógica de que la condición tip es tibolona junto con pal, todas las proteínas únicas en pal deberían estar presentes en tip a menos que tip modifique su expresión. Los resultados muestran que la tibolona devolvió 23 proteínas de la a niveles de expresión similares a los del vehículo (Tabla 4), entre ellos RPL37, eIF4G2, IPO7, las cuales como se mencionó previamente, tienen un rol importante en la regulación de la traducción de proteínas. Lo que sugiere que el efecto protector de la tibolona en las células NHA está relacionado con los procesos de transporte de proteínas principalmente al RE y por vesículas a diferentes compartimientos; de acuerdo con los resultados de GOSlim (Material suplementario 5) se observa que si la regulación a la baja de transporte de proteínas afecta el transporte de péptidos, aminas,

macromoléculas y al establecimiento de proteínas en dichos compartimientos, por lo tanto afectaría el funcionamiento del retículo y de los posibles destinos de esas vesículas; se sugiere que si la tibolona vuelve a estas proteínas a la expresión del vehículo. También retorno a niveles de expresión similares a los del control a las proteínas relacionadas al proceso de traducción lo cual podría evitar de forma preliminar que se induzcan diferentes procesos como inflamación, estrés del RE o muerte celular (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019).

8.5 Respuesta de tibolona frente al ácido palmítico

Los resultados muestran que la tibolona aumentó la expresión de algunas proteínas enriquecidas en términos de proteínas transportadoras (Fig. 7) y (Tabla 5) de vesículas como COPII, y redujo la expresión de proteínas con actividad proapoptótica como la proteína Drebrin-like (DBNL) $p = 2.77E-05$ LFC = -3.104115258, adicionalmente en la comparación con veh IFIT3 regulada al alza $p = 0.001343872$ y LFC = 2.054834577 y es una proteína que puede reversar el efecto de IFIT2 regulando negativamente los procesos apoptóticos (Stawowczyk et al., 2011), mientras que su expresión permanece sin cambios en pal_vs_veh. Es importante destacar que también modificó la expresión proteínas ribosómicas como RPL23 $p = 0.001775566$ y LFC = 1.187426773 que es parte de la subunidad ribosomal 60s y es la subunidad más grande del ribosoma 80s y el cual cataliza el proceso de traducción de proteínas (Odintsova et al., 2003), también, regula al alta la proteína anteriormente descrita eIF4G2 con valor de $p = 0.002254098$ y LFC = 2.455214841. Así mismo, aumentó la proteína de transporte Sec24C (Sec24C) $p = 0.002929742$ LFC = 1.576720125 la proteína de muerte celular programada 6 (PDCD6) $p = 0.002007806$ LFC = 1.339618944. Las dos son proteínas relacionadas a la formación de la cobertura de las vesículas COPII, que también se relacionan a la salida del RE indicando que están favoreciendo el transporte celular evitando la desregulación de la localización de proteínas. No obstante, PDCD6 se considera una proteína con actividad pro apoptótica, sin embargo, esta proteína puede ejercer una regulación negativa de la proliferación celular (Chen et al., 2006) y esto podría ser interesante para prevenir los daños de gliosis debido a que está se caracteriza por la hipertrofia y proliferación descontrolada de los astrocitos (Pekny and Pekna, 2014).

El pretratamiento con tibolona redujo la alfa-glicosidasa lisosomal (GAA) con un $p = 0.000159641$ y un LFC = -1.701963592, lo cual podría sugerir que la tibolona está reduciendo procesos catabólicos del glucógeno (Roig-Zamboni et al., 2017) los cuales se relacionan a la producción de ROS (Quijano et al., 2016). Por otra parte se encontró que tip reduce la expresión de la aconitasa citoplasmática (ACO1) con un $p = 1.41E-05$ y LFC = -2.688103819, esta proteína se encarga de regular la homeostasis de hierro actuando como un quelante (Lushchak et al., 2014) y esta reducción podría resultar nociva para la células. Estos resultados sugieren que la tibolona tiene algunos efectos protectores en las células NHA contra los efectos de pal; se evidencio su rol aumentando la expresión de proteínas de transporte favoreciendo que la localización de proteínas sea correcta. Sin embargo, el rol de algunas proteínas a la que la tibolona les modulo su expresión no es del todo claro (Tabla 5 y Material suplementario 3), y dependiendo del contexto podrían tener efectos detrimetales.

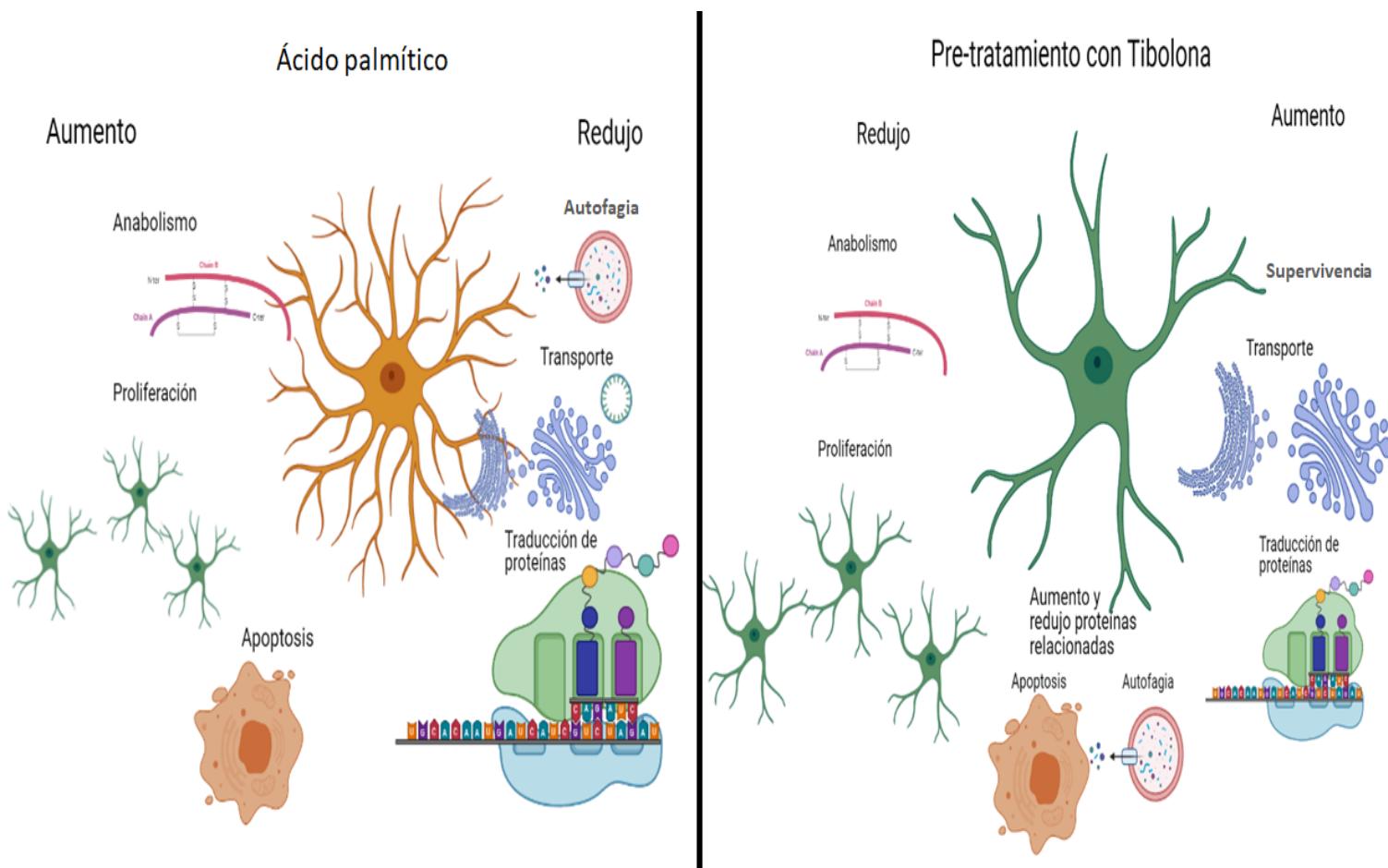


Figura 9. Comparación de la respuesta inducidas por pal y el pretratamiento con tibolona. Resumen de los procesos a los que se relacionan las proteínas expresadas diferencialmente con un de FDR <0.1 y un $p <0.01$ a manera comparativa de los cambios inducidos por pal y tip respectivamente.

8.6. Análisis WGCNA

El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado basado en las abundancias de proteínas en las 18 muestras mostró que las proteínas identificadas expresadas diferencialmente pueden generar una firma proteómica vinculada al uso de los diferentes tratamientos o control (Fig. 10). Se generaron un total de 9 módulos de genes (azul, amarillo, turquesa, rosa, rojo, verde, magenta, morado, negro y gris); la mayoría de los genes se resumieron en el "módulo azul" (Fig. 10a).

De acuerdo con la asociación módulo-rasgo, el módulo rojo tuvo el coeficiente de correlación más alto seguido del turquesa y el rosa, luego se seleccionaron los 3 módulos para su posterior análisis (Fig. 10c). La significación genética (GS) se utilizó para medir el grado de asociación entre el gen o proteína y el rasgo. La pertenencia al módulo (MM) se utilizó para determinar la ubicación de una red global. GS versus MM reflejó la relación entre el tratamiento y los genes. Los resultados revelaron que los módulos rojo, rosado y turquesa eran esenciales en las respuestas generadas por tratamiento (Fig. 10f). Esas proteínas generaron un total de 355 nodos y 2657 aristas y después del algoritmo MCODE se redujo a 110 proteínas hub y 856 aristas en diferentes grupos (Fig. 11 y Material suplementario 7). Estas proteínas al tener alto peso en la red y con varias interacciones son proteínas muy relevantes en el sistema y pueden ser posibles blancos para el entendimiento del daño lipotóxico y del tratamiento con tibolona.

Basándose en el estudio de Yang et al., (2019) se señalaron las proteínas de mayor peso en el sistema, usando las proteínas hub que pasaron el filtro del algoritmo MCODE y luego fueron intersectadas con las proteínas con diferencias significativas de expresión diferencial con un $p_{adj} < 0.05$, estas proteínas son consideradas altamente relevantes ya que al modificarse pueden disturbar gravemente el sistema debido al alto número de interacciones que poseen, y fueron denominadas proteínas clave (Yang et al., 2019). Se obtuvieron un total de 27 proteínas que cumplían esta condición y de estas 10 están relacionadas a la respuesta inducida por el daño lipotóxico generado por pal y 17 la acción de la tibolona en los astrocitos humanos (Tabla 7). Se encontró que al retirar las proteínas que se compartían las diferentes comparaciones, en pal_vs_veh quedaron como proteínas exclusivas ARF3 regulada al alta y IPO7 regulada a la baja (Tabla 7), las

cuales se relacionan a diferentes enfermedades, pero entre ellas a desordenes del sistema nervioso (Fig. 12).

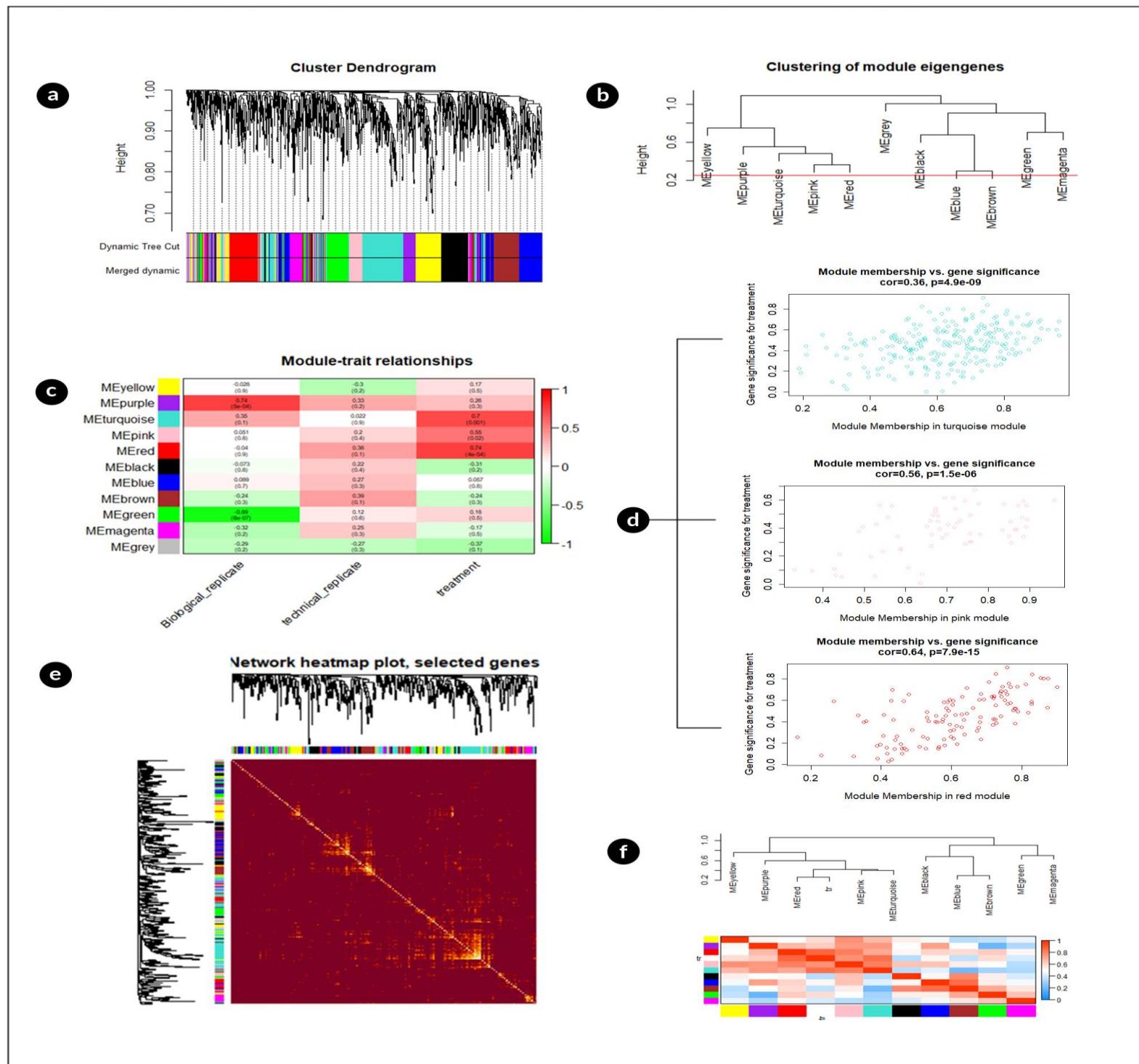


Figura 10. Análisis WGCNA. a). Dendrograma de genes obtenido por agrupamiento jerárquico de ligamiento promedio. La fila de color debajo del dendrograma muestra la asignación de módulo determinada por Dynamic Tree Cut. b). Resumen de la agrupación jerárquica de proteínas por módulos que fueron encontrados en el análisis de

agrupación. Las ramas del dendrograma agrupan proteínas propias que están correlacionados positivamente. c). Gráfico de mapa de calor de superposición topológica en la red de genes. En el mapa de calor, cada fila y columna corresponden a un gen, el color claro denota una superposición topológica baja y el rojo progresivamente más oscuro denota una superposición topológica más alta. Los cuadrados más oscuros a lo largo de la diagonal corresponden a módulos. El dendrograma de genes y la asignación del módulo se muestran a la izquierda y arriba. mi). Mapa de calor de la relación entre el tratamiento y los diferentes módulos d). Diagramas de dispersión de importancia genética (GS) para el peso frente a la pertenencia al módulo (MM) para los módulos "rojo", "rosa" "turquesa". GS y MM exhiben una correlación muy significativa, lo que implica que los genes hub de estos módulos también tienden a estar altamente correlacionados con los tratamientos e). Mapa de calor de superposición topológica en la red de proteínas. En el mapa de calor, cada fila y columna corresponden a una proteína, el color claro denota una superposición topológica baja y el rojo progresivamente más oscuro denota una superposición topológica más alta. Los cuadrados más oscuros a lo largo de la diagonal corresponden a módulos. El dendrograma de proteínas y la asignación del módulo se muestran a la izquierda y arriba. f). Gráfico de mapa de calor de las adyacencias en la red de genes propios, incluido el peso del rasgo. Cada fila y columna en el mapa de calor corresponden a un gen propio del módulo (etiquetado por color) o peso. En el mapa de calor, el color verde representa una adyacencia baja (correlación negativa), mientras que el rojo representa una adyacencia alta (correlación positiva). Los cuadrados de color rojo a lo largo de la diagonal son la relación propia de los módulos a los módulos.

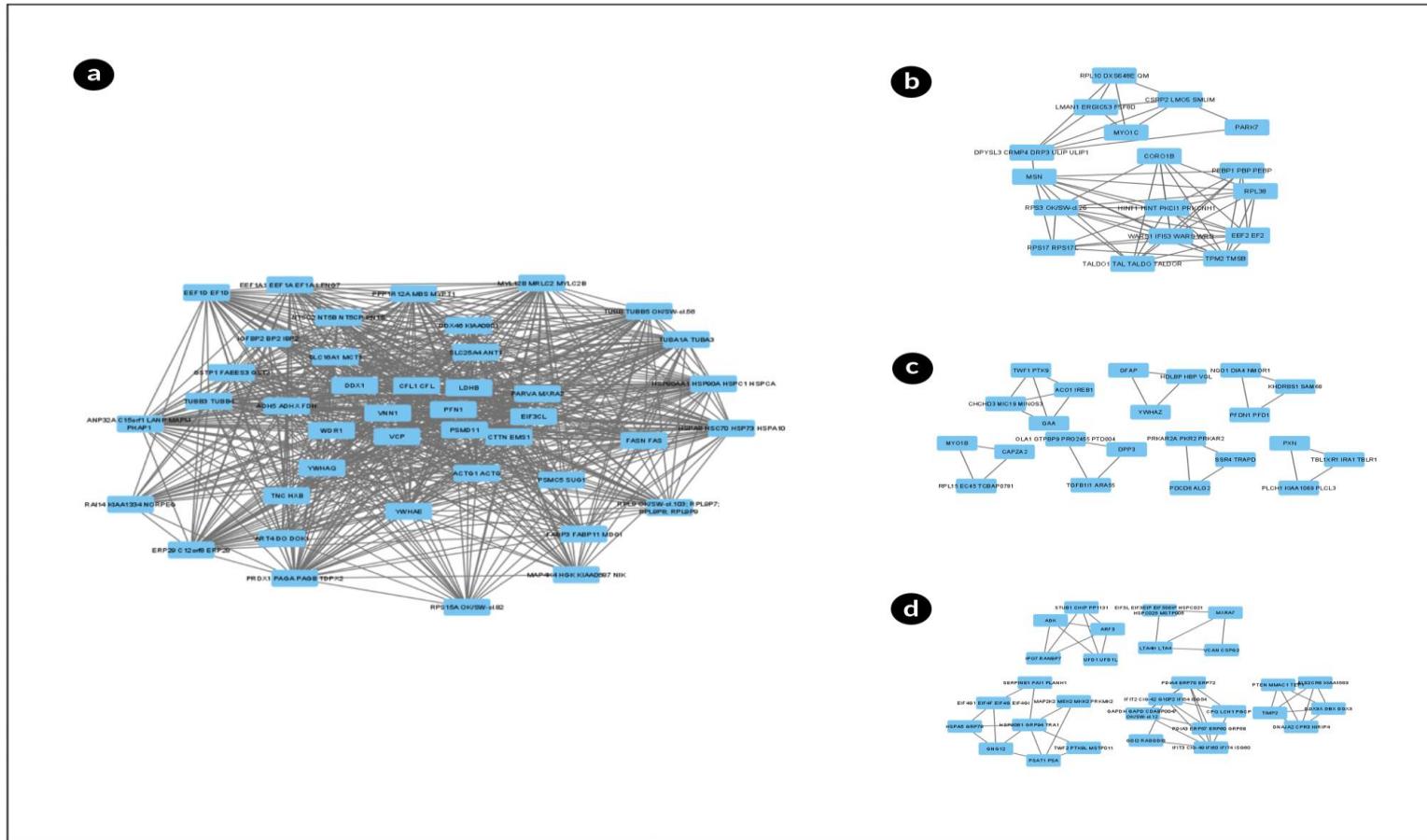


Figura 11. Proteínas hub. Red de interacción proteína-proteína con el GeneID, de los módulos altamente correlacionados de proteínas de WGCNA. Diferentes módulos generados en todo el conjunto de datos, luego de usar el algoritmo MCODE de Cytoscape para reducir los nodos para aquellos con más peso en la red reduciendo de 355 nodos y 2657 aristas a 110 nodos y 856 aristas.

Tabla 6. Proteínas compartidas de los tratamientos al ser comparados con el control

Proteínas compartidas a la baja	Proteínas compartidas al alta
Q96Q42	Q12904
Q9UNE7	P60484
P55263	P00403
P48047	Q9BW60
Q9Y333	Q9UBI6
Q9P2B4	P62851
Q15404	O14737
O60884	Q96DG6
P16035	Q92888
Q92890	P09913
P12270	P09110
O00571	P13010
O43795	
P61313	
Q14677	
P05198	
Q13409	
Q9UHB9	Q9UHB9(modifica su expresión en tip y está al alta)
P53618	

Lista de las proteínas con código “Accession” de Uniprot, compartidas entre pal_vs_veh y and tip_vs_veh al ser comparados. Observando que la mayoría de las proteínas compartidas mantiene un patrón de expresión similar a excepción de la proteína Q9UHB9 que paso de estar regulada a la baja en pal_vs_veh regulada al alta en tip_vs_veh.

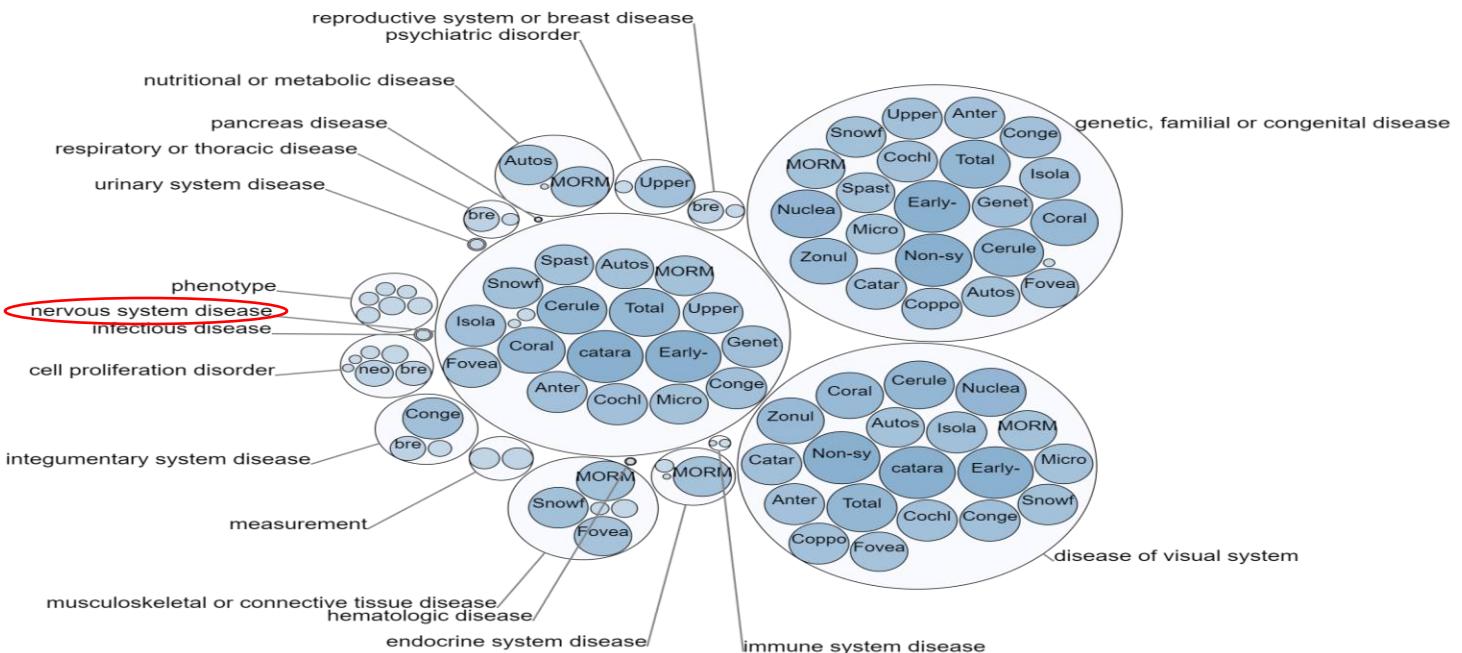
Tabla 7. Proteínas expresadas diferencialmente altamente conectadas

pal_vs_veh_ al alta	pal_vs_veh a la baja	tip_vs_veh al alta	tip_vs_veh a la baja	tip_vs_pal al alta	tip_vs_pal a la baja
ARF3	ALS2 ALS2CR6 KIAA1563	MAP4K4 HGK KIAA0687 NIK	ALS2 ALS2CR6 KIAA1563	Ninguna	CHCHD3 MIC19 MINOS3
PTEN MMAC1 TEP1	STUB1 CHIP PP1131	PLCH1 KIAA1069 PLCL3	TGFB1I1 ARA55		TGFB1I1 ARA55
	ADK	PDCD6 ALG2	CHCHD3 MIC19 MINOS3		ACO1 IREB1
	DNAJA2 CPR3 HIRIP4	CAPZA2	MYO1B		TWF1 PTK9
	TIMP2	TWF2 PTK9L MSTP011	STUB1 CHIP PP1131		DPP3
	IPO7 RANBP7	PTEN MMAC1 TEP1	EIF4G1 EIF4F EIF4G EIF4GI		OLA1 GTPBP9 PRO2455 PTD004
	UFD1 UFD1L	NT5C2 NT5B NT5CP PNT5	TIMP2		GAA
	MYO1B	CPQ LCH1 PGCP	DNAJA2 CPR3 HIRIP4		
		DDX46 KIAA0801	ADK		
		IFIT3 CIG-49 IFI60 IFIT4 ISG60	TWF1 PTK9		

		VNN1	DDX3X DBX DDX3		
		GNG12	OLA1 GTPBP9 PRO2455 PTD004		
		SLC25A4 ANT1	DPP3		
		IFIT2 CIG-42 G10P2 IFI54 ISG54	RPL15 EC45 TCBAP0781		
			UFD1 UFD1L		
			PSMD11		
			SERPINE1 PAI1 PLANH1		

Lista de las proteínas hub que se encontraban en las proteínas expresadas diferencialmente en cada comparación. Al comparar las proteínas hub, intersectadas con las proteínas expresadas diferencialmente, se encontraron dos proteínas hub que son exclusivas de pal, ARF3 regulada al alta e IPO7 regulada a la baja

ARF3



IPO7

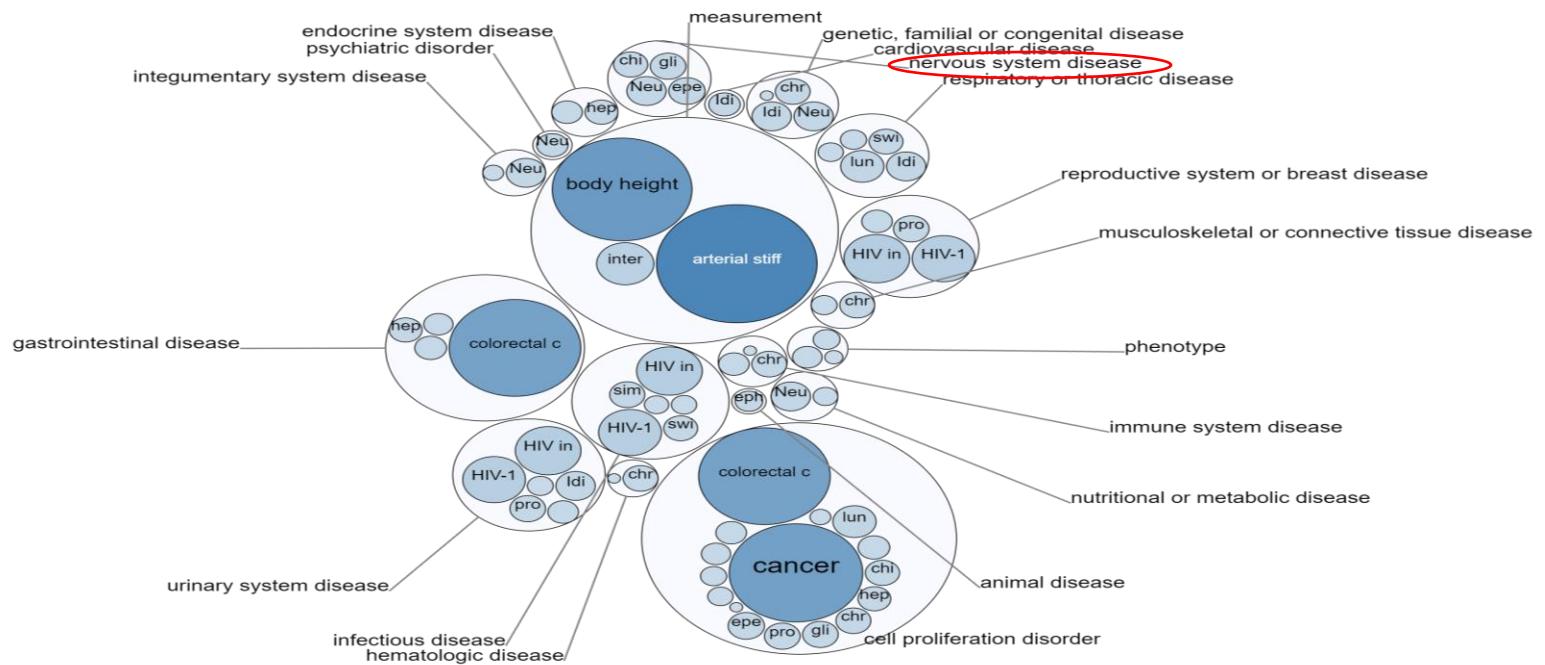


Figura 12. Enfermedades asociadas a las proteínas clave únicas del ácido palmítico. a) principales enfermedades por grupos a ARF3, b) principales enfermedades por grupos relacionadas a IPO7

9. DISCUSIÓN

La expresión diferencial de proteínas de manera exclusiva en pal con un alto peso en las redes, destaco dos proteínas, ARF3 regulada al alta e IPO7 regulada a la baja, lo cual se encuentra relacionado con la activación de p53; característica del estrés de la biogénesis ribosómica y aumento de la unión de Mdm2 a las proteínas ribosómicas L5 y L11 (RPL5 y RPL11) (Golomb et al., 2012). Además la depleción de IPO7 afecta el transporte de otras proteínas ribosomales como RPL23A, RPS7 and RPL5, afectando la biogénesis ribosomal (Bursac et al., 2014; Golomb et al., 2012). Se ha reportado en la literatura que la depleción de varias proteínas ribosomales excepto RPL5 y RPL 11, induce una respuesta por parte p53 que genera una inhibición de la traducción y un bloqueo en las fases del ciclo celular G1 y G2/M (Fumagalli et al., 2012). Esto se relaciona con los resultados obtenidos, porque entre las proteínas reguladas a la baja por pal también se encuentra la proteína ribosomal 60S L37 o RPL37, lo que indicaría una posible afectación de pal en la maquinaria de traducción de proteínas. Es de particular interés, la ausencia de diferencias significativas en la comparación entre tip_vs_veh; en las proteínas IPO7 y RPL37, considerando que tip es un pretratamiento con tibolona seguido de pal, podría significar que la tibolona tendría un rol en la expresión de IPO7 y RPL37 a niveles similares que los observados con el vehículo, lo que podría estar relacionado con su efecto protector. Esta observación concuerda con el estudio de Evans et al., (2019), quienes, en un modelo de ratones con tauopatía, reportaron la reducción de la síntesis de diferentes proteínas ribosomales, algo de RPS y RPL (Evans et al., 2019). Adicionalmente, se ha reportado que en EA se altera la maquinaria de traducción de proteínas, principalmente factores de elongación y proteínas ribosomales (Hernández-Ortega et al., 2016); a nivel celular el estudio reporta que en el modelo de EA los astrocitos mostraron reducción de las proteínas de unión ribosomal y relacionadas a traducción (Rocchio et al., 2019). De manera similar, la síntesis de proteínas reducida se ha asociado con la progresión de la EP (Deshpande et al., 2020). Esto puede indicar que pal genera cambios como los que se pueden ver en la progresión de algunas NDs. En adición a lo anterior, se observó que la tibolona redujo el factor de inicio de la traducción eucariota 4 gamma 1, el cual está relacionado con el inicio del proceso de traducción (Adjibade et al., 2017).

Por otro lado, la proteína ARF3 que se encuentra aumentada en pal_vs_veh está relacionada con el transporte de Golgi a diferentes regiones (Gaudet et al., 2011) y específicamente con el transporte

retrógrado al RE (Yu et al., 2014); lo anterior, muestra que no sólo modificaría la traducción de las proteínas sino también su transporte. Adicionalmente, al comparar las listas, se encuentra que pal reduce la expresión de la subunidad 2 de dinactina (DCTN2); lo anterior está relacionado con el transporte desde el RE al Golgi, la formación del huso mitótico, y que esta subunidad interactúa directamente con las otras subunidades (Echeverri et al., 1996; Staples et al., 2014), lo cual también está reportado en las funciones de gen y proteínas en NCBI (DCTN2 dynactin subunit 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI). Esto resulta interesante, porque en un modelo de ratón, se observó que la disfuncionalidad en la relación dineína/dinactina condujo al desarrollo de Esclerosis lateral amiotrófica (Teuling et al., 2008). Adicionalmente, se ha reportado que la sobreexpresión de DCTN2 es dañina, en el transporte de neuronas motoras y conduce al desarrollo de enfermedades neuromotoras (De Vos and Hafezparast, 2017; LaMonte et al., 2002). No obstante, en este estudio está a la baja y aún no son claros los posibles efectos que tenga la regulación de DCTN2 a la baja en el cerebro.

Otra proteína que se encuentra regulada al alta solamente en pal es RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12), esta proteína es responsable de acetilar las histonas H4 y H2A, activando la transcripción de diferentes genes (Doyon et al., 2004), algunos de estos están asociados con oncogenes, apoptosis, senescencia o reparación del ADN (Doyon et al., 2004). Curiosamente, esta proteína también está relacionada con la proliferación celular (Gartner et al., 2003). Además de las proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria, se sugiere que pal está regulando proteínas relacionadas con los procesos de gliosis, como se observa en el estudio de Liu et al., (2013) en astrocitos de ratón; al considerar que son proteínas únicas en el tratamiento con pal, significaría que la tibolona logró devolver sus niveles de expresión a los del control (Liu et al., 2013). Esto concuerda con lo observado en reportes preliminares que muestran que parte de los efectos protectores de la tibolona en astrocitos están relacionado con la regulación de la inflamación (Del Río et al., 2020; Osorio et al., 2020).

Los resultados de este estudio muestran adicionalmente que entre las proteínas únicas de pal reguladas al alta se encuentran la enoil-CoA reductasa de cadena muy larga (EC 1.3.1.93), succinato-CoA ligasa subunidad beta, mitocondrial (EC 6.2.1.5), y la proteína 1 de elongación de AGs de cadena muy larga (EC 2.3.1.199), las cuales enriquecen significativamente para metabolismo de ácidos grasos y elongación de ácidos grasos. Lo que sugiere una relación con la

síntesis de AGs de cadena muy larga y la síntesis de esfingolípidos a través de la vía metabólica de la esfingosina 1-fosfato (S1P) (Wakashima et al., 2014). La acumulación de AGs de cadena muy larga en el cerebro está relacionada con la desmielinización causada por patologías peroxisomales (Braverman and Eichler, 2009). Por otra parte, la disfunción del sistema de señalización del receptor S1P da lugar a varios defectos vasculares, como la angiogénesis y el aumento de la inflamación debido al aumento de la permeabilidad que genera en los vasos sanguíneos (Obinata and Hla, 2019). Aunque, no se debe afirmar que el efecto de S1P sea detrimental, debido a que S1P puede tener un rol dual en el cerebro, que resulta en protección en algunas condiciones y dañina en otras (Karunakaran and van Echten-Deckert, 2017). Por lo tanto, sería interesante estudiar más a fondo que efectos está teniendo S1P en los astrocitos humanos bajo un insulto con pal.

Al centrarse en las proteínas compartidas entre pal_vs_veh y tip_vs_veh, se destaca la proteína SRP68 que hace parte de SRP, la cual a su vez es necesaria para la translocación de proteínas al RE (Lakkaraju et al., 2007) que pasó de estar regulada a la baja en pal contra veh a regulada al alta en tip_vs_veh. Se ha observado que al generar un SRP reconstituido en ausencia del heterodímero SRP68-SRP72, este carece de actividad de detención de del alargamiento y translocación (Grotwinkel et al., 2014; Siegel and Walter, 1985). La función de detención del alargamiento es fisiológicamente importante en las células de mamíferos ya que la eficiencia de la translocación de proteínas al RE se reduce significativamente cuando se anula la función de detención del alargamiento de SRP, afectando su funcionamiento (Lakkaraju et al., 2007; Mary et al., 2010).

Aparte de las proteínas que la tibolona devolvió a niveles de expresión cercanos a los del control, es importante señalar que algunas de las proteínas expresadas diferencialmente en la comparación tip_vs_pal podrían explicar la respuesta protectora de tibolona (Tabla 5) y (Fig. 7 y 8). Una de esas proteínas es la ubiquitina hidrolasa 14 carboxiterminal (EC 3.4.19.12), que actúa como un inhibidor fisiológico de la degradación asociada al RE a través de la interacción con ERN1; de acuerdo con lo anterior la tibolona podría estar alterando la regulación de autofagia generada por pal en astrocitos (Ortiz-Rodriguez et al., 2018).

Al comparar tip_vs_pal, se observa adicionalmente a la proteína Similar a la debrina o DBNL regulada a la baja. DBNL se une a la actina y tiene un rol en su polimerización (Gaudet et al.,

2011); sin embargo, también se ha demostrado que activa la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) (Ensenat et al., 1999); este proceso que está relacionado con la señalización proapoptótica (Dhanasekaran and Reddy, 2008), lo que indicaría que la tibolona tiene un rol en su regulación lo que podría contribuir a la respuesta protectora observada en el estudio de (Martin-Jiménez et al., 2020). En adición a lo anterior, DBNL también se encuentra asociada a procesos de desgranulación de neutrófilos que se relaciona con procesos inflamatorios (Rocha-Perugini et al., 2017). No obstante, es necesario anotar que este estudio sugiere que la respuesta de tibolona también puede estar asociada a la reducción de la subunidad MIC19 del complejo MICOS. De acuerdo con Darshi et al., (2011), dicha reducción está asociada a cambios en la morfología mitocondrial, causando pérdida de crestas mitocondriales, y puede reducir la eficiencia de las mitocondrias (Darshi et al., 2011).

En las proteínas únicas que encontradas en la comparación de tip_vs_veh, se observa regulada al alta a IFIT3 (proteína inducida por interferón con repeticiones del tetratricopéptido 3). Esta proteína actúa como inhibidor de procesos celulares y virales, migración celular, proliferación viral, señalización y replicación (Pichlmair et al., 2011). Tiene actividad anti proliferativa a través de la regulación positiva de los reguladores negativos del ciclo celular CDKN1A/p21 y CDKN1B/p27. Normalmente, el recambio de CDKN1B/p27 está regulado por COPS5, que se une a CDKN1B/p27 en el núcleo y lo exporta al citoplasma para su degradación dependiente de ubiquitina. IFIT3 secuestra COPS5 en el citoplasma, aumentando así los niveles de la proteína nuclear CDKN1B/p27. Regula al alta a CDKN1A/p21 al regular a la baja MYC, un represor de CDKN1A/p21 (Xiao et al., 2006). Además, esta proteína puede regular negativamente los efectos proapoptóticos de IFIT2, proteína a la cual pal aumento su expresión (Stawowczyk et al., 2011).

También se encontró que el pretratamiento con tibolona aumento la expresión de la proteína quinasa 4 activada por mitógenos (MAP4K4), la cual puede desempeñar un papel en la respuesta al estrés ambiental y citocinas como el TNF- α (Kaneko et al., 2011). Se ha demostrado que esta proteína juega un papel en la inducción de la transducción de ARF (Yue et al., 2014) y en la regulación negativa de la apoptosis (Liu et al., 2011). Por lo tanto, MAP4K4 e IFIT3 podrían estar contribuyendo a atenuar los procesos apoptóticos generados por pal, e IFIT3, además, podría estar previniendo la proliferación excesiva, que es parte del proceso típico de astrogliosis (Karki et al., 2014a). Adicionalmente en la comparación de tip_vs_pal, se observó que tip aumento la expresión

MAP2K1 (Fig. 8), la cual es una proteína que activa la vía MAPK/ERK (Lavoie et al., 2018) necesaria para la supervivencia celular (Liu et al., 2004), esta vía puede fosforilar y activar a CREB (Koga et al., 2019). Esto resulta llamativo debido a que se ha demostrado que CREB en astrocitos y neuronas tiene acción protectora (Pardo et al., 2017). Por lo tanto, esto podría ser parte de la respuesta protectora del pretratamiento con tibolona y sería interesante ver que está pasando cascada abajo de la vía MAPK/ERK en este modelo.

En la comparación con el vehículo, la tibolona incrementó la proteína 6 de muerte celular programada, que cumple diferentes roles en el funcionamiento celular, como la regulación de la proliferación celular y el transporte vesicular desde el RE al Golgi (Okumura et al., 2009), regulando la tamaño de las capas de COPII (McGourty et al., 2016), reparación de la membrana, estabiliza las interacciones de proteínas débiles (Inuzuka et al., 2010; Takeshi et al., 2015), y participa en la aceleración de la apoptosis, aumentando la actividad de la caspasa 3 (Lee et al., 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta que la tibolona redujo la muerte celular en NHA tratados con pal (Martin-Jiménez et al., 2020), no es tan probable que en este caso active la vía proapoptótica.

Por otra parte, la tibolona aumento la expresión de dos proteínas que regulaban la polimerización de la actina y reduciendo la polimerización rápida de ésta, las cuales fueron la subunidad alfa-2 de la proteína de protección F-actina y Twinfilina-2 (Gaudet et al., 2011). Aunque, la tibolona también redujo Twinfilina-1 que reduce la polimerización de actina (Gaudet et al., 2011). Lo cual podría sopesar el efecto inhibitorio de la polimerización de la actina causado por la o subunidad alfa-2 de la proteína de protección F-actina y Twinfilina-2.

Algunas de las vías observadas en éste estudio, no se han reportado como respuesta a las elevadas cantidades de AGs saturados en astrocitos, pero sí en otros tipos de células; cómo la reducción de la traducción provocada por pal en macrófagos mediante la activación de eIF2 α , entre esas proteínas I κ B α que conducen a procesos inflamatorios (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019). Los resultados del presente estudio muestran que pal redujo la expresión de eIF2 α , y, lo que es más importante, los hallazgos recientes sugieren que la fosforilación de eIF2 α no conduce necesariamente a la regulación negativa de la traducción global y no se debe suponer una conexión obligatoria entre la regulación negativa de la traducción y la fosforilación de eIF2 α , por lo tanto una regulación a la baja de eIF2 α no va a inducir un aumento en la traducción de proteínas y por

eso el rol que genera eIF2 α debe ser validado de forma independiente y no únicamente por su expresión o fosforilación (Boye and Grallert, 2020). Por otra parte, resulta interesante que mutaciones en las enzimas encargadas de fosforilar a eIF2 α dan lugar a enfermedades humanas, que a menudo incluyen patologías neurológicas y/o neurodegenerativas (Moon et al., 2018).

Aunque no se encontraron proteínas expresadas diferencialmente que se relacionaran de forma directa a respuesta de inflamación como Nf- κ B, los resultados de este estudio muestran que pal regula al alta las proteínas relacionadas con la transformación de pal a otros intermediarios más complejos como TERC, ELOVL1 y ACAA1, las cuales se relacionan a metabolismo de AGs y a la elongación de AGs de cadena muy larga. Este resultado es interesante porque cuando pal se acumula en la célula puede ser transformado en diacilglicerol y ceramidas, estos productos pueden activar varias vías de señalización que son comunes para la activación de TLR4 mediada por lipopolisacáridos, y se sabe que los productos metabólicos de pal modulan la activación de varias PKC, el estrés del RE y pueden provocar el aumento en la generación de ROS (Korbecki and Bajdak-Rusinek, 2019). E incluso inflamación y muerte celular si se trata de ceramidas (Drosatos and Schulze, 2013; Liu et al., 2013). No obstante, no se sabe qué tipo de productos metabólicos se generaron en este estudio y sería relevante compararlo con los datos metabolómicos de pal en células NHA.

Se ha reportado que el daño causado por pal desencadena la respuesta inflamatoria metabólica en los astrocitos y generalmente se asocia con mecanismos dañinos como el estrés oxidativo, el estrés del RE y los defectos autofágicos (Ortiz-Rodriguez et al., 2018; Osorio et al., 2020). En este sentido, también se ha reportado que la tibolona ejerce funciones protectoras contra la inflamación en modelos experimentales neuronales (Del Río et al., 2020). Los hallazgos de este estudio concuerdan con lo reportado en la literatura (Fig. 9), exceptuando los cambios de expresión asociados con el estrés oxidativo generados por pal, aunque cabe resaltar que la producción de ROS por pal en astrocitos humanos no es muy alta en el estudio hecho por Martin-Jiménez et al., (2020) el cual tiene las mismas de condiciones usadas en este estudio. Similarmente, se reportó en otro estudio con astrocitos tratados con pal 1mM por 24h que no hubo producción ROS (González-Giraldo et al., 2018). Lo cual se podría relacionar a mecanismos de daño y muerte celular generados por pal que son independientes de la producción de ROS (Hickson-Bick et al., 2002) y probablemente esto se deba a que el pal no está siendo usado en la ruta de beta oxidación, sino que

puede estar incrementando la síntesis de ceramida (Blázquez et al., 2001; Patil et al., 2007). Por último, es importante recordar que la tibolona debe ser metabolizada y el efecto protector en el cerebro es generado por alfa-hidroxi y beta-hidroxi-tibolona (Del Río et al., 2020); lo que puede conducir a una dependencia de ser metabolizada correctamente y a la observación de una respuesta aparentemente ambigua por parte de la tibolona.

10. Conclusiones

Debido a la complejidad del daño por ácido palmítico y los diversos mecanismos que este puede activar, resulta difícil comprender este fenómeno centrándose únicamente en una ruta o mecanismo. Por lo tanto, es importante resaltar que este es el primer estudio exhaustivo del perfil proteómico de astrocitos humanos sometidos a un daño lipotóxico permitiendo una interpretación más completa de los mecanismos involucrados, sus resultados amplían nuestra comprensión sobre el efecto lipotóxico del ácido palmítico en astrocitos humanos. Se identificaron 110 proteínas hub y de estas se encontraron 27 diferencialmente expresadas, de las cuales 10 están relacionados a la respuesta inducida por el daño lipotóxico generado por el ácido palmítico y 17 la acción de la tibolona en los astrocitos humanos.

Dentro de las proteínas relacionadas con el daño causado por el ácido palmítico, se encontró una asociación con la activación de la inflamación, respuesta inmune, desregulación de la síntesis de proteína, autofagia, transporte por vesículas y procesos relacionados con el retículo endoplasmático. También se evidenció que algunos de los efectos generados por el ácido palmítico como la reducción de algunas proteínas ribosomales y la desregulación de la traducción de proteínas. Interesantemente el pretratamiento con tibolona retorno la expresión de varias de estas proteínas a los niveles del vehículo. Adicionalmente el pretratamiento con tibolona redujo la expresión de proteínas que activan vías proapoptóticas. La suma de estos factores podría explicar el efecto protector del pretratamiento con tibolona observado en el estudio de (Martin-Jiménez et al., 2020).

En este estudio se destaca la regulación de la traducción y transporte de proteínas como posible mecanismo protector de la tibolona, lo cual podría evitar la activación de estrés del retículo endoplasmático, respuesta inflamatoria y muerte celular inducida por factores inhibidores de la

traducción de proteínas. Sin embargo, la respuesta de la tibolona tiene efectos que pueden parecer detrimetiales para la célula, como la reducción en la expresión de aconitasa y del complejo MICOS o el aumento de una proteína con actividad proapoptótica.

Por lo tanto, no se puede afirmar que el pretratamiento con tibolona revierta completamente el daño causado por el ácido palmítico, pero sí muestra efectos protectores a nivel de astrocitos y al contrastar con lo que se ha reportado previamente, es probable que los efectos benéficos puedan sopesar a los efectos perjudiciales haciendo promisorio su uso para tratar los daños lipotóxicos en astrocitos humanos.

11. RECOMENDACIONES

Se sugiere el estudio del perfil proteómico con una mayor profundidad con el uso de equipos como el TIMS-TOF o el Lumos, y algoritmos que hagan uso del aprendizaje de máquina como el método BoxCar o Prosit. Así mismo se sugiere replicar el estudio con otras células cerebrales implicadas en procesos de neurodegeneración y la integración de diferentes datos ómicos para obtener una interpretación más robusta del sistema. Por último, probablemente se pueda obtener una respuesta más contundente de la tibolona si se usan directamente los metabolitos 3-alfa-hidroxi y 3-beta-hidroxi tibolona.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S. K., Else, P. L., Atkins, T. A., and Hulbert, A. J. (2012). Fatty acid composition of membrane bilayers: Importance of diet polyunsaturated fat balance. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818, 1309–1317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.011>.
- Acaz-Fonseca, E., Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., and Barreto, G. E. (2016). Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* 144, 5–26. doi:[10.1016/j.pneurobio.2016.06.002](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.06.002).
- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M. A., and Garcia-Segura, L. M. (2014). Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17??-estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 389, 48–57.

- doi:10.1016/j.mce.2014.01.009.
- Adjibade, P., Grenier St-Sauveur, V., Bergeman, J., Huot, M. E., Khandjian, E. W., and Mazroui, R. (2017). DDX3 regulates endoplasmic reticulum stress-induced ATF4 expression. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-14262-7.
- Aguiar, R. B. de, Dickel, O. E., Cunha, R. W., Monserrat, J. M., Barros, D. M., and Martinez, P. E. (2006). Estradiol valerate and tibolone: Effects on memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 689–696. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.10.023>.
- Albertazzi, P., Natale, V., Barbolini, C., Teglio, L., and Di Micco, R. (2000). The effect of tibolone versus continuous combined norethisterone acetate and oestradiol on memory, libido and mood of postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas* 36, 223–229. doi:10.1016/s0378-5122(00)00147-x.
- Alnouti, Y., and Klaassen, C. D. (2011). Mechanisms of gender-specific regulation of mouse sulfotransferases (Sults). *Xenobiotica* 41, 187–197. doi:10.3109/00498254.2010.535923.
- Altaf-Ul-Amin, M., Afendi, F. M., Kiboi, S. K., and Kanaya, S. (2014). Systems biology in the context of big data and networks. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/428570.
- Anderson, G., Rodriguez, M., and Reiter, R. J. (2019). Multiple sclerosis: Melatonin, orexin, and ceramide interact with platelet activation coagulation factors and gut-microbiome-derived butyrate in the circadian dysregulation of mitochondria in glia and immune cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20215500.
- Andrabi, S. S., Parvez, S., and Tabassum, H. (2017). Neurosteroids and ischemic stroke: Progesterone a promising agent in reducing the brain injury in Ischemic stroke. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 36, 191–205. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2017017156.
- Antinone, S. E., Ghadge, G. D., Lam, T. T., Wang, L., Roos, R. P., and Green, W. N. (2013). Palmitoylation of superoxide dismutase 1 (SOD1) is increased for familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *J. Biol. Chem.* 288, 21606–21617. doi:10.1074/jbc.M113.487231.
- Arai, T., Wakabayashi, S., Channing, M. A., Dunn, B. B., Der, M. G., Bell, J. M., et al. (1995). Incorporation of [1-carbon-11]palmitate in monkey brain using PET. *J. Nucl. Med.* 36, 2261–2267.
- Arevalo, M. A., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2015). The neuroprotective actions of

- oestradiol and oestrogen receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 17–29. doi:10.1038/nrn3856.
- Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Lagunas, N., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2011). Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J. Mol. Endocrinol.* 46. doi:10.1677/JME-10-0122.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. doi:10.1038/75556.
- Avila-Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Hidalgo-lanussa, O., Baez, E., Gonzalez, J., and Barreto, G. E. (2016). Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 433, 35–46. doi:10.1016/J.MCE.2016.05.024.
- Ávila Rodriguez, M., Garcia-Segura, L. M., Cabezas, R., Torrente, D., Capani, F., Gonzalez, J., et al. (2014). Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144, 294–303. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.07.009.
- Bak, L. K., Schousboe, A., Sonnewald, U., and Waagepetersen, H. S. (2006). Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1285–1297. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600281.
- Bazinet, R. P., and Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 771. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3820>.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* 14, 724–738. doi:10.1016/J.CMET.2011.08.016.
- Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., et al. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-θ subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 2577–2589. doi:10.1172/JCI36714.
- Bentsen, H. (2017). Dietary polyunsaturated fatty acids, brain function and mental health. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28, 1281916. doi:10.1080/16512235.2017.1281916.
- Blaskovic, S., Blanc, M., and Goot, F. G. (2013). What does S-palmitoylation do to membrane proteins? *FEBS J.* 280, 2766–2774. doi:10.1111/febs.12263.

- Blázquez, C., Galve-Roperh, I., and Guzmán, M. (2000). De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 2315–2322. doi:10.1096/fj.00-0122com.
- Blázquez, C., Geelen, M. J., Velasco, G., and Guzmán, M. (2001). The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.* 489, 149–153. doi:10.1016/s0014-5793(01)02089-0.
- Boersema, P. J., Rijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A. J. R. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 4, 484–494. doi:10.1038/nprot.2009.21.
- Borroni, M. V., Vallés, A. S., and Barrantes, F. J. (2016). The lipid habitats of neurotransmitter receptors in brain. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 2662–2670. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.005>.
- Bourgeois, D. L., and Kreeger, P. K. (2017). “Partial least squares regression models for the analysis of kinase signaling,” in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), 523–533. doi:10.1007/978-1-4939-7154-1_32.
- Bowling, H., Bhattacharya, A., Zhang, G., Lebowitz, J. Z., Smith, P. T., Kirshenbaum, K., et al. (2016). BONLAC: A Combinatorial Proteomic Technique to Measure Stimulus-induced Translational Profiles in Brain Slices. *Neuropharmacology* 100, 76–89. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.017.BONLAC.
- Boye, E., and Grallert, B. (2020). eIF2 α phosphorylation and the regulation of translation. *Curr. Genet.* 66, 293–297. doi:10.1007/s00294-019-01026-1.
- Brann, D. w., Dhandapani, K., Wakade, C., Manesh, V. B., and Khan, M. M. (2007). NIH Public Access. *Steroids* 72, 381–405. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Braverman, N., and Eichler, F. (2009). “Peroxisomal Disorders and Neurological Disease,” in, ed. L. R. B. T.-E. of N. Squire (Oxford: Academic Press), 579–588. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.02011-8>.
- Brown, A. M., and Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55, 1263–1271. doi:10.1002/glia.20557.
- Buckman, L. B., Thompson, M. M., Lippert, R. N., Blackwell, T. S., Yull, F. E., and Ellacott, K. L. J. (2014). Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Mol. Metab.* 4, 58–63.

- doi:10.1016/j.molmet.2014.10.001.
- Buratta, M., Castigli, E., Sciacsaluga, M., Pellegrino, R. M., Spinozzi, F., Roberti, R., et al. (2008). Loss of cardiolipin in palmitate-treated GL15 glioblastoma cells favors cytochrome c release from mitochondria leading to apoptosis. *J. Neurochem.* 105, 1019–1031. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05209.x.
- Bursac, S., Brdovcak, M. C., Donati, G., and Volarevic, S. (2014). Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 817–830. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2013.08.014>.
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Báez, E., García-Segura, L. M., et al. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 211. doi:10.3389/fncel.2014.00211.
- Cakir, I., and Nillni, E. A. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress, the Hypothalamus, and Energy Balance. *Trends Endocrinol. Metab.* 30, 163–176. doi:10.1016/j.tem.2019.01.002.
- Calvo-Ochoa, E., Sánchez-Alegría, K., Gómez-Inclán, C., Ferrera, P., and Arias, C. (2017). Palmitic acid stimulates energy metabolism and inhibits insulin/PI3K/AKT signaling in differentiated human neuroblastoma cells: The role of mTOR activation and mitochondrial ROS production. *Neurochem. Int.* 110, 75–83. doi:10.1016/j.neuint.2017.09.008.
- Campana, M., Bellini, L., Rouch, C., Rachdi, L., Coant, N., Butin, N., et al. (2018). Inhibition of central de novo ceramide synthesis restores insulin signaling in hypothalamus and enhances β-cell function of obese Zucker rats. *Mol. Metab.* 8, 23–36. doi:10.1016/j.molmet.2017.10.013.
- Carbon, S., Douglass, E., Dunn, N., Good, B., Harris, N. L., Lewis, S. E., et al. (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* 47, D330–D338. doi:10.1093/nar/gky1055.
- Carney, K. (2014). Proteomic Characterization of Perisynaptic Astrocytes in Synaptic Plasticity.
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., and Manca, C. (2017). Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications . *Front. Physiol.* 8, 902. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00902>.
- Carta, G., Murru, E., Lisai, S., Sirigu, A., Piras, A., Collu, M., et al. (2015). Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acylethanolamides in rat tissues. *PLoS One* 10, e0120424–e0120424.

- doi:10.1371/journal.pone.0120424.
- Chai, L. E., Law, C. K., Mohamad, M. S., Chong, C. K., Choon, Y. W., Deris, S., et al. (2014). Investigating the effects of imputation methods for modelling gene networks using a dynamic bayesian network from gene expression data. *Malays. J. Med. Sci.* 21, 20–27. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24876803>.
- Chavez, J. A., Holland, W. L., Bär, J., Sandhoff, K., and Summers, S. A. (2005). Acid Ceramidase Overexpression Prevents the Inhibitory Effects of Saturated Fatty Acids on Insulin Signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 20148–20153. doi:10.1074/jbc.M412769200.
- Chen, C., Zhong, X., Smith, D. K., Tai, W., Yang, J., Zou, Y., et al. (2019). Astrocyte-Specific Deletion of Sox2 Promotes Functional Recovery after Traumatic Brain Injury. *Cereb. Cortex* 29, 54–69. doi:10.1093/cercor/bhx303.
- Chen, L. N., Wang, Y., Ma, D. L., and Chen, Y. Y. (2006). Short interfering RNA against the PDCD5 attenuates cell apoptosis and caspase-3 activity induced by Bax overexpression. *Apoptosis* 11, 101–111. doi:10.1007/s10495-005-3134-y.
- Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., and Yang, F. (2015). Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 15, 3175–3192. doi:10.1002/pmic.201500108.
- Chen, Y., and Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 137–149. doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C.
- Cho, K., Shibato, J., Agrawal, G. K., Jung, Y. H., Kubo, A., Jwa, N. S., et al. (2008). Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. *J Proteome Res* 7. doi:10.1021/pr800128q.
- Cho, W. C.-S. (2007). Application of proteomics in Chinese medicine research. *Am. J. Chin. Med.* 35, 911–22. doi:10.1142/S0192415X07005375.
- Choe, L., D'Ascenzo, M., Relkin, N. R., Pappin, D., Ross, P., Williamson, B., et al. (2007). 8-Plex Quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics* 7, 3651–3660. doi:10.1002/pmic.200700316.
- Collection, S., VanGuilder, H. D., Freeman, W. M., Mangia, S., Simpson, I. A., Vannucci, S. J., et al. (2014). Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply.

- Front. Cell. Neurosci.* 8, 366. doi:10.3389/fnins.2014.00366.
- Cook, R. L., O'Dwyer, N. J., Donges, C. E., Parker, H. M., Cheng, H. L., Steinbeck, K. S., et al. (2017). Relationship between Obesity and Cognitive Function in Young Women: The Food Mood and Mind Study. *J. Obes.* 2017, 5923862. doi:10.1155/2017/5923862.
- Crane, J. M., Bennett, J. L., and Verkman, A. S. (2009). Live cell analysis of aquaporin-4 M1/M23 interactions and regulated orthogonal array assembly in glial cells. *J. Biol. Chem.* 284, 35850–35860. doi:10.1074/jbc.M109.071670.
- Darshi, M., Mendiola, V. L., Mackey, M. R., Murphy, A. N., Koller, A., Perkins, G. A., et al. (2011). ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining Crista integrity and mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 286, 2918–2932. doi:10.1074/jbc.M110.171975.
- DCTN2 dynactin subunit 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=10540>
[Accessed October 18, 2020].
- de Aguiar, R. B., Dickel, O. E., Cunha, R. W., Monserrat, J. M., Barros, D. M., and Martinez, P. E. (2008). Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology* 9, 285–298. doi:10.1007/s10522-008-9137-7.
- De Vos, K. J., and Hafezparast, M. (2017). Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: Opportunities for translational research? *Neurobiol. Dis.* 105, 283–299. doi:10.1016/j.nbd.2017.02.004.
- Deffur, A., Wilkinson, R. J., Mayosi, B. M., and Mulder, N. M. (2018). ANIMA: Association network integration for multiscale analysis [version 3; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. *Wellcome Open Res.* 3, 27. doi:10.12688/wellcomeopenres.14073.3.
- Del Río, J. P., Molina, S., Hidalgo-Lanussa, O., Garcia-Segura, L. M., and Barreto, G. E. (2020). Tibolone as Hormonal Therapy and Neuroprotective Agent. *Trends Endocrinol. Metab.* 31, 742–759. doi:10.1016/j.tem.2020.04.007.
- del Sol, A., Balling, R., Hood, L., and Galas, D. (2010). Diseases as network perturbations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 566–571. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.010.
- Deshpande, P., Flinkman, D., Hong, Y., Goltseva, E., Siino, V., Sun, L., et al. (2020). Protein synthesis is suppressed in sporadic and familial Parkinson's disease by LRRK2. *FASEB J.*

- n/a. doi:10.1096/fj.202001046R.
- Dhanasekaran, D. N., and Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251. doi:10.1038/onc.2008.301.
- Douglass, J. D., Dorfman, M. D., Fasnacht, R., Shaffer, L. D., and Thaler, J. P. (2017). Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Mol. Metab.* 6, 366–373. doi:10.1016/j.molmet.2017.01.010.
- Dowell, J. A., Johnson, J. A., and Li, L. (2009). Identification of Astrocyte Secreted Proteins with a Combination of Shotgun Proteomics and Bioinformatics. *proteome* 8, 4135–4143. doi:10.1021/pr900248y.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., and Côté, J. (2004). Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1884–1896. doi:10.1128/mcb.24.5.1884-1896.2004.
- Dozio, V., and Sanchez, J. C. (2018). Profiling the proteomic inflammatory state of human astrocytes using DIA mass spectrometry. *06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. J. Neuroinflammation* 15, 331. doi:10.1186/s12974-018-1371-6.
- Dringen, R., and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* 384, 505–516. doi:10.1515/BC.2003.059.
- Drosatos, K., and Schulze, P. C. (2013). Cardiac Lipotoxicity: Molecular Pathways and Therapeutic Implications. *Curr. Heart Fail. Rep.* 10, 109–121. doi:10.1007/s11897-013-0133-0.
- Du, K., Murakami, S., Sun, Y., Kilpatrick, C. L., and Luscher, B. (2017). DHHC7 palmitoylates glucose transporter 4 (Glut4) and regulates Glut4 membrane translocation. *J. Biol. Chem.* 292, 2979–2991. doi:10.1074/jbc.M116.747139.
- Duffy, C. M., Hofmeister, J. J., Nixon, J. P., and Butterick, T. A. (2019). High fat diet increases cognitive decline and neuroinflammation in a model of orexin loss. *Neurobiol. Learn. Mem.* 157, 41–47. doi:10.1016/j.nlm.2018.11.008.
- Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T., and Vallee, R. B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynein reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* 132, 617–633. doi:10.1083/jcb.132.4.617.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009). GOrilla: A tool for

- discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48. doi:10.1186/1471-2105-10-48.
- Elo, L. L., Filen, S., Lahesmaa, R., and Aittokallio, T. (2008). Reproducibility-optimized test statistic for ranking genes in microarray studies. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.* 5, 423–431. doi:10.1109/tcbb.2007.1078.
- Engin, A. (2017). “Eat and Death: Chronic Over-Eating BT - Obesity and Lipotoxicity,” in, eds. A. B. Engin and A. Engin (Cham: Springer International Publishing), 53–80. doi:10.1007/978-3-319-48382-5_3.
- Ensenat, D., Yao, Z., Wang, X. S., Kori, R., Zhou, G., Lee, S. C., et al. (1999). A novel Src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J. Biol. Chem.* 274, 33945–33950. doi:10.1074/jbc.274.48.33945.
- Escande, A., Servant, N., Rabenoelina, F., Auzou, G., Kloosterboer, H., Cavaillès, V., et al. (2009). Regulation of activities of steroid hormone receptors by tibolone and its primary metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 116, 8–14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.03.008>.
- Escartin, C., Pierre, K., Colin, A., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillermier, M., et al. (2007). Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. *J. Neurosci.* 27, 7094 LP – 7104. doi:10.1523/JNEUROSCI.0174-07.2007.
- Espinosa-Raya, J., Neri-Gómez, T., Orozco-Suárez, S., Campos, M. G., and Guerra-Araiza, C. (2012). Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 61, 76–83. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.10.005.
- Evans, H. T., Benetatos, J., van Roijen, M., Bodea, L. L.-G., and Götz, J. (2019). Decreased synthesis of ribosomal proteins in tauopathy revealed by non-canonical amino acid labelling. *EMBO J.* 38, e101174. doi:10.15252/embj.2018101174.
- Fabregat, A., Jupe, S., Matthews, L., Sidiropoulos, K., Gillespie, M., Garapati, P., et al. (2018). The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 46, D649–D655. doi:10.1093/nar/gkx1132.
- Farfán-García, E. D., Castillo-Hernández, M. C., Pinto-Almazán, R., Rivas-Arancibia, S., Gallardo, J. M., and Guerra-Araiza, C. (2014). Tibolone Prevents Oxidation and

- Ameliorates Cholinergic Deficit Induced by Ozone Exposure in the Male Rat Hippocampus. *Neurochem. Res.* 39, 1776–1786. doi:10.1007/s11064-014-1385-0.
- Farr, S. A., Yamada, K. A., Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Xu, L., Miller, N. E., et al. (2008). Obesity and Hypertriglyceridemia Produce Cognitive Impairment. *Endocrinology* 149, 2628–2636. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-1722>.
- Feist, A. M., Herrgård, M. J., Thiele, I., Reed, J. L., and Palsson, B. (2009). Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 129–143. doi:10.1038/nrmicro1949.
- Fluck, E., File, S. E., and Rymer, J. (2002). Cognitive effects of 10 years of hormone-replacement therapy with tibolone. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22, 62–67. doi:10.1097/00004714-200202000-00010.
- Frigo, L. M., Canelles, S., Freire-Regatillo, A., Argente-Arizón, P., Barrios, V., Argente, J., et al. (2017). Estradiol Uses Different Mechanisms in Astrocytes from the Hippocampus of Male and Female Rats to Protect against Damage Induced by Palmitic Acid. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 330. doi:10.3389/fnmol.2017.00330.
- Fumagalli, S., Ivanenkov, V. V., Teng, T., and Thomas, G. (2012). Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev.* 26, 1028–1040. doi:10.1101/gad.189951.112.
- Gartner, W., Rossbacher, J., Zierhut, B., Daneva, T., Base, W., Weissel, M., et al. (2003). The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 56, 79–93. doi:10.1002/cm.10136.
- Garzón, D., Cabezas, R., Vega, N., Ávila-Rodríguez, M., Gonzalez, J., G??mez, R. M., et al. (2016). Novel Approaches in Astrocyte Protection: from Experimental Methods to Computational Approaches. *J. Mol. Neurosci.* 58, 483–492. doi:10.1007/s12031-016-0719-6.
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., and Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief. Bioinform.* 12, 449–462. doi:10.1093/bib/bbr042.
- Genazzani, A. R., Pluchino, N., Bernardi, F., Centofanti, M., and Luisi, M. (2006). Beneficial effect of tibolone on mood, cognition, well-being, and sexuality in menopausal women. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2, 299.

- Gessulat, S., Schmidt, T., Zolg, D. P., Samaras, P., Schnatbaum, K., Zerweck, J., et al. (2019). ProSIT: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat. Methods* 16, 509–518. doi:10.1038/s41592-019-0426-7.
- Gibbs, R. B., Edwards, D., Lazar, N., Nelson, D., and Talameh, J. (2006). Effects of Long-Term Hormone Treatment and of Tibolone on Monoamines and Monoamine Metabolites in the Brains of Ovariectomised, Cynomologous Monkeys. *J. Neuroendocrinol.* 18, 643–654.
- Giles, C., Takechi, R., Mellett, N. A., Meikle, P. J., Dhaliwal, S., and Mamo, J. C. (2016). The Effects of Long-Term Saturated Fat Enriched Diets on the Brain Lipidome. *PLoS One* 11, e0166964. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166964>.
- Giuliani, A. (2017). The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. *Drug Discov. Today* 22, 1069–1076. doi:10.1016/j.drudis.2017.01.005.
- Glenn, W. S., Stone, S. E., Ho, S. H., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., et al. (2017). Bioorthogonal Noncanonical Amino Acid Tagging (BONCAT) Enables Time-Resolved Analysis of Protein Synthesis in Native Plant Tissue. *Plant Physiol.* 173, 1543–1553. doi:10.1104/pp.16.01762.
- Golomb, L., Bublik, D. R., Wilder, S., Nevo, R., Kiss, V., Grabusic, K., et al. (2012). Importin 7 and exportin 1 Link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal Biogenesis. *Mol. Cell* 45, 222–232. doi:10.1016/j.molcel.2011.11.022.
- Gomes-Alves, P., Imrie, M., Gray, R. D., Nogueira, P., Ciordia, S., Pacheco, P., et al. (2010). SELDI-TOF biomarker signatures for cystic fibrosis, asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Biochem.* 43, 168–177. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.10.006.
- González-Giraldo, Y., Forero, D. A., Echeverria, V., García-Segura, L. M., and Barreto, G. E. (2019). Tibolone attenuates inflammatory response by palmitic acid and preserves mitochondrial membrane potential in astrocytic cells through estrogen receptor beta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 486, 65–78. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.017>.
- González-Giraldo, Y., García-Segura, L. M., Echeverria, V., and Barreto, G. E. (2018). Tibolone Preserves Mitochondrial Functionality and Cell Morphology in Astrocytic Cells Treated with Palmitic Acid. *Mol. Neurobiol.* 55, 4453–4462. doi:10.1007/s12035-017-0667-3.
- Gonzalo, S., and Linder, M. E. (1998). SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Mol. Biol. Cell* 9, 585–97. doi:10.1091/mbc.9.3.585.
- Goodman, T., and Hajhosseini, M. K. (2015). Hypothalamic tanyocytes-masters and servants of

- metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front. Neurosci.* 9, 387. doi:10.3389/fnins.2015.00387.
- Gouw, J. W., Krijgsveld, J., and Heck, A. J. R. (2010). Quantitative Proteomics by Metabolic Labeling of Model Organisms. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 11–24. doi:10.1074/mcp.R900001-MCP200.
- Govind, A. P., Sreeja, S., and Thampan, R. V. (2003). Estradiol dependent anchoring of the goat uterine estrogen receptor activation factor (E-RAF) at the endoplasmic reticulum by a 55 kDa anchor protein (ap55). *J. Cell. Biochem.* 89, 94–107. doi:10.1002/jcb.10483.
- Granholm, A.-C., Bimonte-Nelson, H. A., Moore, A. B., Nelson, M. E., Freeman, L. R., and Sambamurti, K. (2008). Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J. Alzheimers. Dis.* 14, 133–45.
- Greaves, J., Gorleku, O. A., Salaun, C., and Chamberlain, L. H. (2010). Palmitoylation of the SNAP25 protein family: Specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J. Biol. Chem.* 285, 24629–24638. doi:10.1074/jbc.M110.119289.
- Grotwinkel, J. T., Wild, K., Segnitz, B., and Sinning, I. (2014). SRP RNA remodeling by SRP68 explains its role in protein translocation. *Science (80-.).* 344, 101–104. doi:10.1126/science.1249094.
- Guerra-Araiza, C., Amorim, M. A. R., Camacho-Arroyo, I., and Garcia-Segura, L. M. (2007). Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein Tau in the rat cerebellum. *Dev. Neurobiol.* 67, 510–520. doi:10.1002/dneu.20383.
- Gupta, B., Mittal, P., Khuteta, R., and Bhargava, A. (2013). A Comparative Study of CEE, Tibolone, and DHEA as Hormone Replacement Therapy for Surgical Menopause. *J. Obstet. Gynecol. India* 63, 194–198. doi:10.1007/s13224-012-0297-7.
- Gupta, S., Knight, A. G., Gupta, S., Keller, J. N., and Bruce-Keller, A. J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–1071. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x.
- Guzmán, C. B., Zhao, C., Deighton-Collins, S., Kleerekoper, M., Benjamins, J. A., and Skafar, D. F. (2007). Agonist Activity of the 3-Hydroxy Metabolites of Tibolone Through the Oestrogen Receptor in the Mouse N20.1 Oligodendrocyte Cell Line and Normal Human

- Astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* 19, 958–965. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01611.x.
- Han, D., Jin, J., Woo, J., Min, H., Kim, Y., and Engineering, B. (2014). Dataset brief. 1–15. doi:10.1002/pmic.201300495.This.
- Han, D. K., Eng, J., Zhou, H., and Aebersold, R. (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 19, 946–951. doi:10.1038/nbt1001-946.
- Hansen, H. S. (2013). Effect of Diet on Tissue Levels of Palmitoylethanolamide. *CNS Neurodisord. - Drug Targets* 12, 17–25. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/1871527311312010006>.
- He, Y., Zhou, L., Fan, Z., Liu, S., and Fang, W. (2018). Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N-acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.* 9, 568. doi:10.1038/s41419-018-0593-y.
- Henderson, M. X., Wirak, G. S., Zhang, Y. quan, Dai, F., Ginsberg, S. D., Dolzhanskaya, N., et al. (2016). Neuronal ceroid lipofuscinosis with DNAJC5/CSP α mutation has PPT1 pathology and exhibit aberrant protein palmitoylation. *Acta Neuropathol.* 131, 621–637. doi:10.1007/s00401-015-1512-2.
- Henis, Y. I., Hancock, J. F., and Prior, I. A. (2009). Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review). *Mol. Membr. Biol.* 26, 80–92. doi:10.1080/09687680802649582.
- Hernández-Cáceres, M. P., Toledo-Valenzuela, L., Díaz-Castro, F., Ávalos, Y., Burgos, P., Narro, C., et al. (2019). Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5 . *Front. Endocrinol.* 10, 176. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00176>.
- Hernández-Ortega, K., García-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J. J., and Ferrer, I. (2016). Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol.* 26, 593–605. doi:10.1111/bpa.12335.
- Hickson-Bick, D. L. M., Sparagna, G. C., Buja, L. M., and McMillin, J. B. (2002). Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 282, H656–H664. doi:10.1152/ajpheart.00726.2001.
- Hidalgo-Lanussa, O., Ávila-Rodríguez, M., Baez-Jurado, E., Zamudio, J., Echeverría, V., García-

- Segura, L. M., et al. (2018). Tibolone Reduces Oxidative Damage and Inflammation in Microglia Stimulated with Palmitic Acid through Mechanisms Involving Estrogen Receptor Beta. *Mol. Neurobiol.* 55, 5462–5477. doi:10.1007/s12035-017-0777-y.
- Hofling, M., Carlström, K., Svane, G., Azavedo, E., Kloosterboer, H., and Von Schoultz, B. (2005). Different effects of tibolone and continuous combined estrogen plus progestogen hormone therapy on sex hormone binding globulin and free testosterone levels – an association with mammographic density. *Gynecol. Endocrinol.* 20, 110–115. doi:10.1080/09513590400021151.
- Holland, W. L., Brozinick, J. T., Wang, L.-P., Hawkins, E. D., Sargent, K. M., Liu, Y., et al. (2007). Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 5, 167–179. doi:10.1016/j.cmet.2007.01.002.
- Hsiao, Y., Lin, C., Liao, H., Chen, Y., Lin, S., Yung-Hsuan, H., et al. (2014). Palmitic Acid-Induced Neuron Cell Cycle G2/M Arrest and Endoplasmic Reticular Stress through Protein Palmitoylation in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. doi:10.3390/ijms151120876.
- Hsu, J.-L., Huang, S.-Y., Chow, N.-H., and Chen, S.-H. (2003). Stable-Isotope Dimethyl Labeling for Quantitative Proteomics. *Anal. Chem.* 75, 6843–6852. doi:10.1021/ac0348625.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A., and Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S96-104. doi:10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.s96.
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V., and Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. Lipid Res.* 62, 107–128. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>.
- Innis, S. M. (2016). Palmitic Acid in Early Human Development. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1952–1959. doi:10.1080/10408398.2015.1018045.
- Innis, S. M., and Dyer, R. (1997). Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in form. *J. Nutr.* 127, 1311–1319. doi:10.1093/jn/127.7.1311.
- Inuzuka, T., Suzuki, H., Kawasaki, M., Shibata, H., Wakatsuki, S., and Maki, M. (2010).

- Molecular basis for defect in Alix-binding by alternatively spliced isoform of ALG-2 (ALG-2GF122) and structural roles of F122 in target recognition. *BMC Struct. Biol.* 10. doi:10.1186/1472-6807-10-25.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., et al. (1999). The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* 18, 2411–2423. doi:10.1093/emboj/18.9.2411.
- Jäkel, S., and Görlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* 17, 4491–4502. doi:10.1093/emboj/17.15.4491.
- Jeffries, O., Geiger, N., Rowe, I. C. M., Tian, L., McClafferty, H., Chen, L., et al. (2010). Palmitoylation of the S0-S1 linker regulates cell surface expression of voltage- and calcium-activated potassium (BK) channels. *J. Biol. Chem.* 285, 33307–33314. doi:10.1074/jbc.M110.153940.
- Joseph, M., and Nagaraj, R. (1995). Conformations of peptides corresponding to fatty acylation sites in proteins. A circular dichroism study. *J. Biol. Chem.* 270, 19439–19445. doi:10.1074/jbc.270.33.19439.
- Joshi, K., and Patil, D. (2017a). “Chapter 9 - Proteomics A2 - Patwardhan, Bhushan,” in, ed. R. B. T.-I. A. in D. D. Chaguturu (Boston: Academic Press), 273–294. doi:<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-801814-9.00009-X>.
- Joshi, K., and Patil, D. (2017b). *Proteomics*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801814-9.00009-X.
- Kamburov, A., Cavill, R., Ebbels, T. M. D., Herwig, R., and Keun, H. C. (2011). Integrated pathway-level analysis of transcriptomics and metabolomics data with IMPaLA. *Bioinformatics* 27, 2917–2918. doi:10.1093/bioinformatics/btr499.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361. doi:10.1093/nar/gkw1092.
- Kaneko, S., Chena, X., Lua, P., Yao, X., Wright, T. G., Rajurkar, M., et al. (2011). Smad inhibition by the Ste20 kinase misshapen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11127–11132. doi:10.1073/pnas.1104128108.
- Kang, R., Wan, J., Arstikaitis, P., Takahashi, H., Huang, K., Bailey, A. O., et al. (2008). Neural

- palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456, 904–909. doi:10.1038/nature07605.
- Kang, R., Wang, L., Sanders, S. S., Zuo, K., Hayden, M. R., and Raymond, L. A. (2019). Altered Regulation of Striatal Neuronal N-Methyl-D-Aspartate Receptor Trafficking by Palmitoylation in Huntington Disease Mouse Model. *Front. Synaptic Neurosci.* 11, 3. doi:10.3389/fnsyn.2019.00003.
- Karki, P., Smith, K., Johnson, J., and Lee, E. (2014a). Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: Role of transforming growth factor-?? in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 389, 58–64. doi:10.1016/j.mce.2014.01.010.
- Karki, P., Webb, A., Zerguine, A., Choi, J., Son, D. S., and Lee, E. (2014b). Mechanism of raloxifene-induced upregulation of glutamate transporters in rat primary astrocytes. *Glia* 62, 1270–1283. doi:10.1002/glia.22679.
- Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Hirvonen, J., Fielding, B. A., Virtanen, K., et al. (2010). Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes* 59, 2171–2177. doi:10.2337/db09-0138.
- Karpievitch, Y. V., Dabney, A. R., and Smith, R. D. (2012). Normalization and missing value imputation for label-free LC-MS analysis. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 1. doi:10.1186/1471-2105-13-S16-S5.
- Karunakaran, I., and van Echten-Deckert, G. (2017). Sphingosine 1-phosphate – A double edged sword in the brain. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1859, 1573–1582. doi:10.1016/j.bbamem.2017.03.008.
- Kedaigle, A., and Fraenkel, E. (2018). Turning omics data into therapeutic insights. *Curr. Opin. Pharmacol.* 42, 95–101. doi:10.1016/j.coph.2018.08.006.
- Khanna, M., Qin, K. N., Wang, R. W., and Cheng, K. C. (1995). Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 270, 20162–20168. doi:10.1074/jbc.270.34.20162.
- Kim, D. W., Glendining, K. A., Grattan, D. R., and Jasoni, C. L. (2016). Maternal Obesity in the Mouse Compromises the Blood-Brain Barrier in the Arcuate Nucleus of Offspring. *Endocrinology* 157, 2229–2242. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2016-1014>.
- Kim, J. Y., Lee, H. J., Lee, S.-J., Jung, Y. H., Yoo, D. Y., Hwang, I. K., et al. (2017). Palmitic

- Acid-BSA enhances Amyloid- β production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1 α and Akt/NF- κ B pathways. *Sci. Rep.* 7, 4335. doi:10.1038/s41598-017-04175-w.
- Kimes, A. S., Sweeney, D., London, E. D., and Rapoport, S. I. (1983). Palmitate incorporation into different brain regions in the awake rat. *Brain Res.* 274, 291–301. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90707-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90707-2).
- Kloosterboer, H. J. (2001). Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 76, 231–238. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00044-9).
- Kloosterboer, H. J. (2004). Tissue-selectivity: The mechanism of action of tibolone. *Maturitas* 48, 30–40. doi:10.1016/j.maturitas.2004.02.012.
- Kloosterboer, H. J. (2011). Historical milestones in the development of tibolone (Livial®). *Climacteric* 14, 609–621. doi:10.3109/13697137.2011.580639.
- Kobeissy, F. H., Sadasivan, S., Oli, M. W., Robinson, G., Larner, S. F., Zhang, Z., et al. (2008). Neuroproteomics and systems biology-based discovery of protein biomarkers for traumatic brain injury and clinical validation. *Proteomics - Clin. Appl.* 2, 1467–1483. doi:10.1002/prca.200800011.
- Koga, Y., Tsurumaki, H., Aoki-Saito, H., Sato, M., Yatomi, M., Takehara, K., et al. (2019). Roles of Cyclic AMP Response Element Binding Activation in the ERK1/2 and p38 MAPK Signalling Pathway in Central Nervous System, Cardiovascular System, Osteoclast Differentiation and Mucin and Cytokine Production. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1346. doi:10.3390/ijms20061346.
- Korbecki, J., and Bajdak-Rusinek, K. (2019). The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.* 68, 915–932. doi:10.1007/s00011-019-01273-5.
- Krijgsveld, J., Ketting, R. F., Mahmoudi, T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C. P., et al. (2003). Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat Biotech* 21, 927–931. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt848>.
- Lakkaraju, A. K. K., Abrami, L., Lemmin, T., Blaskovic, S., Kunz, B., Kihara, A., et al. (2012). Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome–translocon complex. *EMBO J.* 31, 1823 LP – 1835. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/31/7/1823.abstract>.
- Lakkaraju, A. K. K., Luyet, P. P., Parone, P., Falguières, T., and Strub, K. (2007). Inefficient

- targeting to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle elicits selective defects in post-ER membrane trafficking. *Exp. Cell Res.* 313, 834–847. doi:10.1016/j.yexcr.2006.12.003.
- LaMonte, B. H., Wallace, K. E., Holloway, B. A., Shelly, S. S., Ascaño, J., Tokito, M., et al. (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34, 715–727. doi:10.1016/S0896-6273(02)00696-7.
- Landgraf, P., Antileo, E. R., Schuman, E. M., and Dieterich, D. C. (2015). “BONCAT: Metabolic Labeling, Click Chemistry, and Affinity Purification of Newly Synthesized Proteomes BT - Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols,” in, eds. A. Gautier and M. J. Hinner (New York, NY: Springer New York), 199–215. doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_14.
- Lanussa, O., Ávila-Rodriguez, M., García-Segura, L., González, J., Echeverria, V., Aliev, G., et al. (2016). Microglial dependent protective effects of neuroactive steroids. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 15, 242–249. doi:10.2174/1871527315666160202122032.
- Lavoie, H., Sahmi, M., Maisonneuve, P., Marullo, S. A., Thevakumaran, N., Jin, T., et al. (2018). MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 554, 549–553. doi:10.1038/nature25478.
- Lee, J. A., Hall, B., Allsop, J., Alqarni, R., and Allen, S. P. (2020). Lipid metabolism in astrocytic structure and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2020.07.017.
- Lee, J. H., Rho, S. B., and Chun, T. (2005). Programmed cell death 6 (PDCD6) protein interacts with death-associated protein kinase 1 (DAPk1): Additive effect on apoptosis via caspase-3 dependent pathway. *Biotechnol. Lett.* 27, 1011–1015. doi:10.1007/s10529-005-7869-x.
- Lee, M.-C., Yasuda, R., and Ehlers, M. D. (2010). Metaplasticity at single glutamatergic synapses. *Neuron* 66, 859–870. doi:10.1016/j.neuron.2010.05.015.
- Lerman, J. A., Hyduke, D. R., Latif, H., Portnoy, V. A., Lewis, N. E., Orth, J. D., et al. (2012). In silico method for modelling metabolism and gene product expression at genome scale. *Nat. Commun.* 3. doi:10.1038/ncomms1928.
- Levental, I., Grzybek, M., and Simons, K. (2010). Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry* 49, 6305–6316. doi:10.1021/bi100882y.
- Li, K., Li, J., Zheng, J., and Qin, S. (2019). Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases.

- Aging Dis.* 10, 664. doi:10.14336/ad.2018.0720.
- Liddelow, S. A., and Sofroniew, M. V. (2019). Astrocytes usurp neurons as a disease focus. *Nat. Neurosci.* 22, 512–513. doi:10.1038/s41593-019-0367-6.
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. A. T. M., Jørgensen, C., Miron, I. M., et al. (2007). Systematic Discovery of In Vivo Phosphorylation Networks. *Cell* 129, 1415–1426. doi:10.1016/j.cell.2007.05.052.
- Listenberger, L. L., Ory, D. S., and Schaffer, J. E. (2001). Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 14890–14895. doi:10.1074/jbc.M010286200.
- Liu, A. W., Cai, J., Zhao, X. L., Jiang, T. H., He, T. F., Fu, H. Q., et al. (2011). ShRNA-targeted MAP4K4 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Clin. Cancer Res.* 17, 710–720. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0331.
- Liu, B., and Qian, S.-B. (2014). Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 301–315. doi:10.1002/wrna.1212.
- Liu, L., and Chan, C. (2014). IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* 35, 309–321. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.016.
- Liu, L., Martin, R., and Chan, C. (2013). Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol. Aging* 34, 540–550. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.017>.
- Liu, M., Hurn, P. D., Roselli, C. E., and Alkayed, N. J. (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 135–141. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600331.
- Liu, M., Kelley, M. H., Herson, P. S., and Hurn, P. D. (2010). Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol.* 35, 127–143. doi:10.1016/j.jaac.2010.01.025. Measured.
- Liu, R., Wang, D., Shi, Q., Fu, Q., Hizon, S., and Xiang, Y. K. (2012). Palmitoylation Regulates Intracellular Trafficking of β 2 Adrenergic Receptor/Arrestin/Phosphodiesterase 4D Complexes in Cardiomyocytes. *PLoS One* 7, e42658. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042658>.
- Liu, X., Yan, S., Zhou, T., Terada, Y., and Erikson, R. L. (2004). The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene* 23, 763–776.

- doi:10.1038/sj.onc.1207188.
- Lizcano, F., and Guzmán, G. (2014). Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/757461.
- Lopez-Rodriguez, A. B., Ávila-Rodriguez, M., Vega-vela, N. E., Capani, F., Gonzalez, J., Garciá-Segura, L. M., et al. (2015). *Estrogen effects on traumatic brain injury.*
- Lopez-rodriguez, A. B., Marco, A., and Vega-vela, N. E. (2011). Neuroprotection by Exogenous Estrogenic Compounds. doi:10.1016/B978-0-12-801479-0.00006-1.
- Lu, W., and Roche, K. W. (2012). Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 470–479.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.008>.
- Lushchak, O. V., Piroddi, M., Galli, F., and Lushchak, V. I. (2014). Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Rep.* 19, 8–15.
doi:10.1179/1351000213Y.0000000073.
- Maeda, A., Okano, K., Park, P. S.-H., Lem, J., Crouch, R. K., Maeda, T., et al. (2010). Palmitoylation stabilizes unliganded rod opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8428 LP – 8433.
Available at: <http://www.pnas.org/content/107/18/8428.abstract>.
- Malnar, M., Hecimovic, S., Mattsson, N., and Zetterberg, H. (2014). Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiol. Dis.* 72, 37–47.
doi:10.1016/j.nbd.2014.05.033.
- Martin-Jiménez, C. A., Gaitán-Vaca, D. M., Echeverria, V., González, J., and Barreto, G. E. (2016). Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. *Mol. Neurobiol.*, 1–20. doi:10.1007/s12035-016-0193-8.
- Martin-Jiménez, C. A., Gaitán-Vaca, D. M., Echeverria, V., González, J., and Barreto, G. E. (2017). Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. *Mol. Neurobiol.* 54, 7096–7115. doi:10.1007/s12035-016-0193-8.
- Martin-Jiménez, C., González, J., Vesga, D., Aristizabal, A., and Barreto, G. E. (2020). Tibolone Ameliorates the Lipotoxic Effect of Palmitic Acid in Normal Human Astrocytes. *Neurotox. Res.* doi:10.1007/s12640-020-00247-4.
- Mary, C., Scherrer, A., Huck, L., Lakkaraju, A. K. K., Thomas, Y., Johnson, A. E., et al. (2010). Residues in SRP9/14 essential for elongation arrest activity of the signal recognition particle

- define a positively charged functional domain on one side of the protein. *RNA* 16, 969–979. doi:10.1261/rna.2040410.
- McEwen, B. S., Akama, K. T., Spencer-Segal, J. L., and Milner, T. A. (2012). Estrogen effects on the brain:actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav. Neurosci.* 126, 4–16. doi:10.1037/a0026708.Estrogen.
- McGourty, C. A., Akopian, D., Walsh, C., Gorur, A., Werner, A., Schekman, R., et al. (2016). Regulation of the CUL3 Ubiquitin Ligase by a Calcium-Dependent Co-adaptor. *Cell* 167, 525-538.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.09.026.
- McLachlan, G. J., Bean, R. W., and Ng, S. K. (2017). “Clustering,” in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), 345–362. doi:10.1007/978-1-4939-6613-4_19.
- McLean, F. H., Grant, C., Morris, A. C., Horgan, G. W., Polanski, A. J., Allan, K., et al. (2018). Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Sci. Rep.* 8, 1–9. doi:10.1038/s41598-018-30265-4.
- Medina-Ceja, L., Guerrero-Cazares, H., Canales-Aguirre, A., Morales-Villagran, A., and Feria-Velasco, A. (2007). [Structural and functional characteristics of glutamate transporters: how they are related to epilepsy and oxidative stress]. *Rev. Neurol.* 45, 341–352.
- Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J., and Mann, M. (2018). BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nat. Methods* 15, 440–448. doi:10.1038/s41592-018-0003-5.
- Melkonian, K. A., Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Chen, J. Z., et al. (1999). Role of lipid modification in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J Biol Chem* 274, 3910–3917. doi:10.1074/jbc.274.6.3910.
- Melo, H. M., Seixas da Silva, G. da S., Sant’Ana, M. R., Teixeira, C. V. L., Clarke, J. R., Miya Coreixas, V. S., et al. (2020). Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α . *Cell Rep.* 30, 2180-2194.e8. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.072.
- Merrick, B. A., Dhungana, S., Williams, J. G., Aloor, J. J., Peddada, S., Tomer, K. B., et al. (2011). Proteomic profiling of S-acylated macrophage proteins identifies a role for palmitoylation in mitochondrial targeting of phospholipid scramblase 3. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006007-M110.006007. doi:10.1074/mcp.M110.006007.
- Miller, A. A., and Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive

- impairment. *Brain. Behav. Immun.* 42, 10–21. doi:10.1016/j.bbi.2014.04.001.
- Mishra, N. (2010). *INTRODUCTION TO Principles and Applications*.
- Miyagi, M., and Sekhar Rao, K. . (2006). PROTEOLYTIC 18O-LABELING STRATEGIES FOR QUANTITATIVE PROTEOMICS. *Indian J. Exp. Biol.* 26, 121–136. doi:10.1002/mas.
- Modelska, K., and Cummings, S. (2002). Tibolone for Postmenopausal Women: Systematic Review of Randomized Trials. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 16–23. doi:10.1210/jcem.87.1.8141.
- Moon, S. L., Sonenberg, N., and Parker, R. (2018). Neuronal Regulation of eIF2 α ; Function in Health and Neurological Disorders. *Trends Mol. Med.* 24, 575–589. doi:10.1016/j.molmed.2018.04.001.
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4, e5045–e5045. doi:10.1371/journal.pone.0005045.
- Morselli, E., Frank, A. P., Palmer, B. F., Rodriguez-Navas, C., Criollo, A., and Clegg, D. J. (2015). A sexually dimorphic hypothalamic response to chronic high-fat diet consumption. *Int. J. Obes.* 40, 206. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.114>.
- Mueller, G. M., Maarouf, A. B., Kinlough, C. L., Sheng, N., Kashlan, O. B., Okumura, S., et al. (2010). Cys palmitoylation of the β subunit modulates gating of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 285, 30453–30462. doi:10.1074/jbc.M110.151845.
- Müller, A., Stellmacher, A., Freitag, C. E., Landgraf, P., and Dieterich, D. C. (2015). Monitoring Astrocytic Proteome Dynamics by Cell Type-Specific Protein Labeling. *PLoS One* 10, e0145451. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145451>.
- Naumenko, V. S., and Ponimaskin, E. (2018). Palmitoylation as a functional regulator of neurotransmitter receptors. *Neural Plast.* 2018. doi:10.1155/2018/5701348.
- Neri-Gómez, T., Espinosa-Raya, J., Díaz-Cintra, S., Segura-Uribe, J., Orozco-Suárez, S., Gallardo, J. M., et al. (2017). Tibolone modulates neuronal plasticity through regulating Tau, GSK3 β /Akt/PI3K pathway and CDK5 p35/p25 complexes in the hippocampus of aged male mice. *Neural Regen. Res.* 12, 588–595. doi:10.4103/1673-5374.205098.
- Nerurkar, P. V., Johns, L. M., Buesa, L. M., Kipyakwai, G., Volper, E., Sato, R., et al. (2011). Momordica charantia (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and

- neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 8, 64. doi:10.1186/1742-2094-8-64.
- Ng, Y. W., and Say, Y. H. (2018). Palmitic acid induces neurotoxicity and gliotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ* 6, e4696–e4696. doi:10.7717/peerj.4696.
- O'Farrell, P. H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874754/>.
- Obinata, H., and Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 31, 617–625. doi:10.1093/intimm/dxz037.
- Oddi, S., Dainese, E., Sandiford, S., Fezza, F., Lanuti, M., Chiurchiù, V., et al. (2011). Effects of palmitoylation of Cys415 in helix 8 of the CB1 cannabinoid receptor on membrane localization and signalling. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2635–2651. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01658.x.
- Odintsova, T. I., Müller, E.-C., Ivanov, A. V., Egorov, T. A., Bienert, R., Vladimirov, S. N., et al. (2003). Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *J. Protein Chem.* 22, 249–258. doi:10.1023/a:1025068419698.
- Okumura, M., Ichioka, F., Kobayashi, R., Suzuki, H., Yoshida, H., Shibata, H., et al. (2009). Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a Ca²⁺-dependent adaptor that bridges Alix and TSG101. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 237–241. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.015.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., Tang, S.-C., Mattson, M. P., and Arumugam, T. V (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 59, 278–292. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.09.001.
- Oliveira, F. H. M., MacHado, A. R. P., and Andrade, A. O. (2018). On the Use of t -Distributed Stochastic Neighbor Embedding for Data Visualization and Classification of Individuals with Parkinson's Disease. *Comput. Math. Methods Med.* 2018. doi:10.1155/2018/8019232.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., et al. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376–386. doi:10.1074/mcp.M200025-MCP200.
- Orth, J. D., Thiele, I., and Palsson, B. O. (2010). What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.*

- 28, 245–248. doi:10.1038/nbt.1614.
- Ortiz-Rodriguez, A., Acaz-Fonseca, E., Boya, P., Arevalo, M. A., and Garcia-Segura, L. M. (2018). Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-018-1183-9.
- Ortiz-Rodriguez, A., and Arevalo, M. A. (2020). The contribution of astrocyte autophagy to systemic metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21072479.
- Osorio, D., Pinzón, A., Martín-Jiménez, C., Barreto, G. E., and González, J. (2020). Multiple Pathways Involved in Palmitic Acid-Induced Toxicity: A System Biology Approach. *Front. Neurosci.* 13, 1–14. doi:10.3389/fnins.2019.01410.
- Palomba, S., Orio, F., Falbo, A., Oppedisano, R., Tolino, A., and Zullo, F. (2008). Tibolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas. *Fertil. Steril.* 90, 165–173. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.061.
- Palsson, B. Ø. (2015). *Systems Biology: Constraint-based Reconstruction and Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press doi:DOI: 10.1017/CBO9781139854610.
- Pannasch, U., and Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci.* 36, 405–417. doi:10.1016/j.tins.2013.04.004.
- Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., and Lyakhovich, V. (2014). Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/472459.
- Papin, J. A., Hunter, T., Palsson, B. O., and Subramaniam, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 99–111. doi:10.1038/nrm1570.
- Pardo, L., Valor, L. M., Eraso-Pichot, A., Barco, A., Golbano, A., Hardingham, G. E., et al. (2017). CREB Regulates Distinct Adaptive Transcriptional Programs in Astrocytes and Neurons. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-06231-x.
- Parikshak, N. N., Gandal, M. J., and Geschwind, D. H. (2015). Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Genet.* 16, 441–458. doi:10.1038/nrg3934.
- Park, H. R., Kim, J.-Y., Park, K.-Y., and Lee, J. (2011). Lipotoxicity of Palmitic Acid on Neural Progenitor Cells and Hippocampal Neurogenesis. *Toxicol. Res.* 27, 103–110.

- doi:10.5487/TR.2011.27.2.103.
- Parker, C. E., Warren, M. R., and Viorel, M. (2010). "Mass spectrometry for proteomics," in *Neuroproteomics*, ed. O. Alzate.
- Patel-Murray, N. L., Natasha, P.-M., Fraenkel, E., and Burge, C. B. (2019). Understanding Neurodegenerative Disease-Relevant Molecular Effects of Perturbagens Using a Multi-Omics Approach Signature redacted A u th o r Signature redacted Signature redacted ' CHIVES. Massachusetts Institute of Technology Available at: <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/122721> [Accessed October 7, 2020].
- Patil, S., Melrose, J., and Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2131–2141. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05797.x.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2014). Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. *Physiol. Rev.* 94. doi:10.1152/physrev.00041.2013.
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166. doi:10.1038/jcbfm.2011.149.
- Philip L. Ross‡, Y. N. H. (2004). Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents*. *Mol. Cell. Proteomics* 3.12, 1154–1169. doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200.
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C. A., Górná, M. W., Baumann, C. L., Burkard, T. R., et al. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.* 12, 624–630. doi:10.1038/ni.2048.
- Pinto-Almazán, R., Calzada-Mendoza, C. C., Campos-Lara, M. G., and Guerra-Araiza, C. (2012). Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *J. Neurosci. Res.* 90, 878–886. doi:10.1002/jnr.22808.
- Pinto-Almazán, R., Rivas-Arancibia, S., Farfán-García, E. D., Rodríguez-Martínez, E., and Guerra-Araiza, C. (2014). Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol* 58, 441–448.
- Pinto-Almazán, R., Segura-Uribe, J. J., Farfán-García, E. D., and Guerra-Araiza, C. (2017). Effects of Tibolone on the Central Nervous System: Clinical and Experimental Approaches.

- Biomed Res. Int.* 2017. doi:10.1155/2017/8630764.
- Pinto-Almazan, R., Segura-Uribe, J. J., Soriano-Ursúa, M. A., Farfán-García, E. D., Gallardo, J. M., and Guerra-Araiza, C. (2018). Effect of tibolone pretreatment on kinases and phosphatases that regulate the expression and phosphorylation of Tau in the hippocampus of rats exposed to ozone. *Neural Regen. Res.* 13, 440–448. doi:10.4103/1673-5374.228726.
- Pirhaji, L., Milani, P., Leidl, M., Curran, T., Avila-Pacheco, J., Clish, C. B., et al. (2016). Revealing disease-associated pathways by network integration of untargeted metabolomics. *Nat. Methods* 13, 770–776. doi:10.1038/nmeth.3940.
- Portovedo, M., Ignacio-Souza, L. M., Bombassaro, B., Coope, A., Reginato, A., Razolli, D. S., et al. (2015). Saturated fatty acids modulate autophagy's proteins in the hypothalamus. *PLoS One* 10, e0119850–e0119850. doi:10.1371/journal.pone.0119850.
- Prathipati, P., and Mizuguchi, K. (2015). Systems Biology Approaches to a Rational Drug Discovery Paradigm. *Curr. Top. Med. Chem.* 16, 1009–1025. doi:10.2174/1568026615666150826114524.
- Prickett, C., Brennan, L., and Stolwyk, R. (2015). Examining the relationship between obesity and cognitive function: A systematic literature review. *Obes. Res. Clin. Pract.* 9, 93–113. doi:10.1016/j.orcp.2014.05.001.
- Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., and Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol.* 8, 28–42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.11.010>.
- Ramírez, D., Saba, J., Turati, J., Carniglia, L., Imsen, M., Mohn, C., et al. (2019). NDP-MSH reduces oxidative damage induced by palmitic acid in primary astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* 31, e12673. doi:10.1111/jne.12673.
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., et al. (2019). G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 47, W191–W198. doi:10.1093/nar/gkz369.
- Reddy, D. S., and Estes, W. A. (2016). Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 543–561. doi:10.1016/j.tips.2016.04.003.
- Reed, M. J., and Kloosterboer, H. J. (2004). Tibolone: A selective tissue estrogenic activity regulator. *Maturitas* 48, 54–56. doi:10.1016/j.maturitas.2004.02.013.
- Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., et al.

- (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat. Protoc.* 14, 482–517. doi:10.1038/s41596-018-0103-9.
- Rey, J. R. C., Cervino, E. V., Rentero, M. L., Crespo, E. C., Alvaro, A. O., and Casillas, M. (2009). Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. *Open Orthop. J.* 3, 14–21. doi:10.2174/1874325000903010014.
- Reyna, M. A., Leiserson, M. D. M., and Raphael, B. J. (2018). Hierarchical HotNet: Identifying hierarchies of altered subnetworks. in *Bioinformatics* (Oxford University Press), i972–i980. doi:10.1093/bioinformatics/bty613.
- Rhea, E. M., Salameh, T. S., Logsdon, A. F., Hanson, A. J., Erickson, M. A., and Banks, W. A. (2017). Blood-Brain Barriers in Obesity. *AAPS J.* 19, 921–930. doi:10.1208/s12248-017-0079-3.
- Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., and Siciliano, G. (2009). Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *J. Biol. Phys.* 35, 317–336. doi:10.1007/s10867-009-9157-9.
- Ritz, A., Poirel, C. L., Tegge, A. N., Sharp, N., Simmons, K., Powell, A., et al. (2016). Pathways on demand: Automated reconstruction of human signaling networks. *npj Syst. Biol. Appl.* 2. doi:10.1038/njpsba.2016.2.
- Rocchio, F., Tapella, L., Manfredi, M., Chisari, M., Ronco, F., Ruffinatti, F. A., et al. (2019). Gene expression, proteome and calcium signaling alterations in immortalized hippocampal astrocytes from an Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis.* 10, 24. doi:10.1038/s41419-018-1264-8.
- Rocha-Perugini, V., Gordon-Alonso, M., and Sánchez-Madrid, F. (2017). “Role of drebrin at the immunological synapse,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer New York LLC), 271–280. doi:10.1007/978-4-431-56550-5_15.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P. J., Koerner, C., Lumbierres, M., et al. (2005). An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science (80-.).* 307, 1746 LP – 1752. doi:10.1126/science.1105654.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., et al. (2005). Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. *Int. Rev. Cytol.* 247, 89–164. doi:10.1016/S0074-7696(05)47003-5.

- Roig-Zamboni, V., Cobucci-Ponzano, B., Iacono, R., Ferrara, M. C., Germany, S., Bourne, Y., et al. (2017). Structure of human lysosomal acid α -glucosidase-a guide for the treatment of Pompe disease. *Nat. Commun.* 8, 1111. doi:10.1038/s41467-017-01263-3.
- Rothstein, J. D. (2009). Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 65, S3–S9. doi:10.1002/ana.21543.
- Rozen, S., Cudkowicz, M. E., Bogdanov, M., Matson, W. R., Kristal, B. S., Beecher, C., et al. (2005). Metabolomic analysis and signatures in motor neuron disease. *Metabolomics* 1, 101–108. doi:10.1007/s11306-005-4810-1.
- Sadava, D. E., Hillis, D. M., Heller, C. H., and Berenbaum, M. (2014). *libro life 10th.pdf*.
- Salaun, C., Greaves, J., and Chamberlain, L. H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* 191, 1229–1238. doi:10.1083/jcb.201008160.
- Sanders, S. S., Martin, D. D. O., Butland, S. L., Lavallée-Adam, M., Calzolari, D., Kay, C., et al. (2015). Curation of the Mammalian Palmitoylome Indicates a Pivotal Role for Palmitoylation in Diseases and Disorders of the Nervous System and Cancers. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004405. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004405>.
- Schellenberger, J., Park, J. O., Conrad, T. M., and Palsson, B. T. (2010). BiGG: A Biochemical Genetic and Genomic knowledgebase of large scale metabolic reconstructions. *BMC Bioinformatics* 11, 213. doi:10.1186/1471-2105-11-213.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Sergi, D., Morris, A. C., Kahn, D. E., McLean, F. H., Hay, E. A., Kubitz, P., et al. (2018). Palmitic acid triggers inflammatory responses in N42 cultured hypothalamic cells partially via ceramide synthesis but not via TLR4. *Nutr. Neurosci.*, 1–14. doi:10.1080/1028415X.2018.1501533.
- Shamim, A., Mahmood, T., Ahsan, F., Kumar, A., and Bagga, P. (2018). Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clin. Nutr. Exp.* 20, 1–19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.05.001>.
- Shang, Y., Xu, X., Duan, X., Guo, J., Wang, Y., Ren, F., et al. (2014). Hsp70 and Hsp90 oppositely regulate TGF- β signaling through CHIP/Stub1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 387–392. doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.124.
- Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., et al.

- (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci* 18, 1819–1831.
- Shih, A. Y., Johnson, D. A., Wong, G., Kraft, A. D., Jiang, L., Erb, H., et al. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* 23, 3394–3406. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-08-03394.2003.
- Shiio, Y., and Aebersold, R. (2006). Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 1, 139–145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.22>.
- Si, Y., Liu, P., Li, P., and Brutnell, T. P. (2014). Model-based clustering for RNA-seq data. *Bioinformatics* 30, 197–205. doi:10.1093/bioinformatics/btt632.
- Siegel, V., and Walter, P. (1985). Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. *J. Cell Biol.* 100, 1913–1921. doi:10.1083/jcb.100.6.1913.
- Simeoni, C., Dinicola, S., Cucina, A., Mascia, C., and Bizzarri, M. (2018). “Systems biology approach and mathematical modeling for analyzing phase-space switch during epithelial-mesenchymal transition,” in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), 95–123. doi:10.1007/978-1-4939-7456-6_7.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31. Available at: <https://doi.org/10.1038/35036052>.
- Skaper, S. D., Facci, L., Barbierato, M., Zusso, M., Bruschetta, G., Impellizzeri, D., et al. (2015). N-Palmitoylethanolamine and Neuroinflammation: a Novel Therapeutic Strategy of Resolution. *Mol. Neurobiol.* 52, 1034–1042. doi:10.1007/s12035-015-9253-8.
- Slenter, D. N., Kutmon, M., Hanspers, K., Riutta, A., Windsor, J., Nunes, N., et al. (2018). WikiPathways: A multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Res.* 46, D661–D667. doi:10.1093/nar/gkx1064.
- Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrielink, J. A. F. O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., et al. (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell* 169, 326-337.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.03.031.
- Smíne, S., Obry, A., Kadri, S., Hardouin, J., Fréret, M., Amri, M., et al. (2017). Brain proteomic modifications associated to protective effect of grape extract in a murine model of obesity.

- Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1865, 578–588.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.001>.
- Smith, S. A., Blake, T. A., Ifa, D. R., Cooks, R. G., and Ouyang, Z. (2007). Dual-Source Mass Spectrometer with MALDI-LIT-ESI Configuration. *J. Proteome Res.* 6, 837–845.
doi:[10.1021/pr060514i](https://doi.org/10.1021/pr060514i).
- Sofroniew, M. V (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16.
doi:[10.1038/nrn3898](https://doi.org/10.1038/nrn3898).
- Sohn, H., and Park, M. (2019). Palmitoylation-mediated synaptic regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Arch. Pharm. Res.* 42, 426–435. doi:[10.1007/s12272-019-01134-z](https://doi.org/10.1007/s12272-019-01134-z).
- Somunkiran, A., Erel, C. T., Demirci, F., and Senturk, M. L. (2007). The effect of tibolone versus 17 β -estradiol on climacteric symptoms in women with surgical menopause: A randomized, cross-over study. *Maturitas* 56, 61–68. doi:[10.1016/j.maturitas.2006.06.004](https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2006.06.004).
- Song, X., Huang, Y., Neuhouser, M. L., Tinker, L. F., Vitolins, M. Z., Prentice, R. L., et al. (2017). Dietary long-chain fatty acids and carbohydrate biomarker evaluation in a controlled feeding study in participants from the Women's Health Initiative cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 105, 1272–1282. doi:[10.3945/ajcn.117.153072](https://doi.org/10.3945/ajcn.117.153072).
- Sorensen, T. I. A., Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Obesity as a clinical and public health problem: Is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 400–404. doi:[10.1016/j.bbalip.2009.12.011](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.011).
- Staples, C. J., Myers, K. N., Beveridge, R. D. D., Patil, A. A., Howard, A. E., Barone, G., et al. (2014). Ccdc13 is a novel human centriolar satellite protein required for ciliogenesis and genome stability. *J. Cell Sci.* 127, 2910–2919. doi:[10.1242/jcs.147785](https://doi.org/10.1242/jcs.147785).
- Stawowczyk, M., Van Scyoc, S., Kumar, K. P., and Reich, N. C. (2011). The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 7257–7266. doi:[10.1074/jbc.M110.207068](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.207068).
- Steckelbroeck, S., Oyesanmi, B., Jin, Y., Lee, S.-H. H., Kloosterboer, H. J., and Penning, T. M. (2006). Tibolone Metabolism in Human Liver Is Catalyzed by 3 α /3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities of the Four Isoforms of the Aldo-Keto Reductase (AKR)1C Subfamily. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1300 LP – 1309. doi:[10.1124/jpet.105.091587](https://doi.org/10.1124/jpet.105.091587).
- Steele, M. L., and Robinson, S. R. (2012). Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 423.e1–13.
doi:[10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.018](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.018).

- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R. S., Egan, J. M., et al. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18, 1085–1088. doi:10.1002/hipo.20470.
- Suomi, T., Seyednasrollah, F., Jaakkola, M. K., Faux, T., and Elo, L. L. (2017). ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing. *PLoS Comput. Biol.* 13, 1–10. doi:10.1371/journal.pcbi.1005562.
- Syahir, A., Usui, K., Tomizaki, K., Kajikawa, K., and Mihara, H. (2015). Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. *Microarrays* 4, 228–244. doi:10.3390/microarrays4020228.
- Takeshi, T., Kojima, K., Zhang, W., Sasaki, K., Ito, M., Suzuki, H., et al. (2015). Structural analysis of the complex between Penta-Ef-Hand Alg-2 protein and sec31a peptide reveals a novel target recognition mechanism of Alg-2. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3677–3699. doi:10.3390/ijms16023677.
- Tan, B. L., and Norhaizan, M. E. (2019). Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients* 11, 1–22. doi:10.3390/nu11112579.
- TANG, B. O., LI, Y., ZHAO, L., YUAN, S., WANG, Z., LI, B. O., et al. (2013). Stable isotope dimethyl labeling combined with LTQ mass spectrometric detection, a quantitative proteomics technology used in liver cancer research. *Biomed. Reports* 1, 549–554. doi:10.3892/br.2013.100.
- Teuling, E., van Dis, V., Wulf, P. S., Haasdijk, E. D., Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C., et al. (2008). A novel mouse model with impaired dynein/dynactin function develops amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like features in motor neurons and improves lifespan in SOD1-ALS mice. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2849–2862. doi:10.1093/hmg/ddn182.
- Thiele, I., and Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat. Protoc.* 5, 93–121. doi:10.1038/nprot.2009.203.
- Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R. M. T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M. K., et al. (2013). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat. Biotechnol.* 31, 419–425. doi:10.1038/nbt.2488.
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., et al. (2003). Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein

- Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 1895–1904. doi:10.1021/ac0262560.
- Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J., and Ngo, S. T. (2018). Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 10. doi:10.3389/fnmol.2018.00010.
- Tracy, L. M., Bergqvist, F., Ivanova, E. V., Jacobsen, K. T., and Iverfeldt, K. (2013). Exposure to the saturated free fatty acid palmitate alters BV-2 microglia inflammatory response. *J. Mol. Neurosci.* 51, 805–812. doi:10.1007/s12031-013-0068-7.
- Tsuboi, K., Ikematsu, N., Uyama, T., Deutsch, D. G., and Ueda, A. T. and N. (2013). Biosynthetic Pathways of Bioactive N-Acylethanolamines in Brain. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 12, 7–16. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/1871527311312010005>.
- Tu, T. H., Kim, H., Yang, S., Kim, J. K. G., and Kim, J. K. G. (2019). Linoleic acid rescues microglia inflammation triggered by saturated fatty acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 201–206. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.047>.
- Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., et al. (2014). Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 69, 1212–1226. doi:10.1093/gerona/glt177.
- Tuncbag, N., Braunstein, A., Pagnani, A., Huang, S. S. C., Chayes, J., Borgs, C., et al. (2013). Simultaneous reconstruction of multiple signaling pathways via the prize-collecting steiner forest problem. in *Journal of Computational Biology* (J Comput Biol), 124–136. doi:10.1089/cmb.2012.0092.
- Tuncbag, N., Gosline, S. J. C., Kedaigle, A., Soltis, A. R., Gitter, A., and Fraenkel, E. (2016). Network-Based Interpretation of Diverse High-Throughput Datasets through the Omics Integrator Software Package. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1004879. doi:10.1371/journal.pcbi.1004879.
- Ulloth, J. E., Casiano, C. A., and De Leon, M. (2003). Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.* 84, 655–668. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12562510>.
- Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E., and Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity

- and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 209–214. doi:10.1016/j.bbalip.2009.10.006.
- van Horssen, J., van Schaik, P., and Witte, M. (2019). Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? *Neurosci. Lett.* 710, 132931. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.050>.
- Vaske, C. J., Benz, S. C., Sanborn, J. Z., Earl, D., Szeto, C., Zhu, J., et al. (2010). Inference of patient-specific pathway activities from multi-dimensional cancer genomics data using PARADIGM. *Bioinformatics* 26. doi:10.1093/bioinformatics/btq182.
- Vegeto, E., Villa, A., Della Torre, S., Crippa, V., Rusmini, P., Cristofani, R., et al. (2020). The role of sex and sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. *Endocr. Rev.* 41, 273–319.
- Verheul, H. A. M., and Kloosterboer, H. J. (2006). Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 195–204. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.037.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 338–349. doi:10.1016/j.bbalip.2009.12.006.
- Wakashima, T., Abe, K., and Kihara, A. (2014). Dual functions of the trans-2-enoyl-CoA reductase TER in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway and in fatty acid elongation. *J. Biol. Chem.* 289, 24736–24748. doi:10.1074/jbc.M114.571869.
- Walker, J. M., Dixit, S., Saulsberry, A. C., May, J. M., and Harrison, F. E. (2017). Reversal of high fat diet-induced obesity improves glucose tolerance, inflammatory response, β-amylloid accumulation and cognitive decline in the APP/PSEN1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 100, 87–98. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.004>.
- Wang, C., Liu, Y., and Cao, J.-M. (2014). G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15412–15425.
- Wang, Z., Liu, D., Wang, F., Liu, S., Zhao, S., Ling, E.-A. A., et al. (2012). Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF-κB signalling. *Br. J. Nutr.* 107, 229–241. doi:10.1017/S0007114511002868.
- Webber, J. T., Kaushik, S., and Bandyopadhyay, S. (2018). Integration of Tumor Genomic Data with Cell Lines Using Multi-dimensional Network Modules Improves Cancer Pharmacogenomics. *Cell Syst.* 7, 526-536.e6. doi:10.1016/j.cels.2018.10.001.

- Weiser, M., Levi, L., Zamora, D., Biegon, A., Sangiovanni, J. P., Davidson, M., et al. (2019). Effect of Adjunctive Estradiol on Schizophrenia among Women of Childbearing Age: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry* 76, 1009–1017. doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.1842.
- Welsh, A. W., Lannin, D. R., Young, G. S., Sherman, M. E., Figueroa, J. D., Henry, N. L., et al. (2012). Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 118–126. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1236.
- Wong, K. L., Wu, Y. R., Cheng, K. S., Chan, P., Cheung, C. W., Lu, D. Y., et al. (2014). Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *Pharmacol. Reports* 66, 1106–1113. doi:10.1016/j.pharep.2014.07.009.
- Wood, L. B., Winslow, A. R., and Strasser, S. D. (2015). Systems biology of neurodegenerative diseases. *Integr. Biol. (United Kingdom)* 7, 758–775. doi:10.1039/c5ib00031a.
- World Health Organization (2016). Obesity and overweight. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- World Health Organization (2020). Obesity. Available at: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity> [Accessed November 10, 2020].
- Wu, W., Jamshidi, N., Eraly, S. A., Liu, H. C., Bush, K. T., Palsson, B. O., et al. (2013). Multispecific drug transporter Slc22a8 (Oat3) regulates multiple metabolic and signaling pathways. *Drug Metab. Dispos.* 41, 1825–1834. doi:10.1124/dmd.113.052647.
- Wynn, M. L., Consul, N., Merajver, S. D., and Schnell, S. (2012). Logic-based models in systems biology: A predictive and parameter-free network analysis method. *Integr. Biol. (United Kingdom)* 4, 1332–1337. doi:10.1039/c2ib20193c.
- Xiao, S., Li, B., Zhu, H. Q., Song, M. G., Pan, X. R., Jia, P. M., et al. (2006). RIG-G as a key of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16448–16453. doi:10.1073/pnas.0607830103.
- Yan, P., Tang, S., Zhang, H., Guo, Y., Zeng, Z., and Wen, Q. (2016). Nerve growth factor protects against palmitic acid-induced injury in retinal ganglion cells. *Neural Regen. Res.* 11, 1851–1856. doi:10.4103/1673-5374.194758.
- Yang, H., and Li, X. (2012). The role of fatty acid metabolism and lipotoxicity in pancreatic β -cell injury: Identification of potential therapeutic targets. *Acta Pharm. Sin. B* 2, 396–402. doi:10.1016/j.apsb.2012.05.003.

- Yang, J.-W., Rodrigo, R., Felipo, V., and Lubec, G. (2005). Proteome Analysis of Primary Neurons and Astrocytes from Rat Cerebellum. *J. Proteome Res.* 4, 768–788. doi:10.1021/pr049774v.
- Yang, S.-H., Liu, R., Perez, E. J., Wen, Y., Stevens, S. M., Valencia, T., et al. (2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4130–4135. doi:10.1073/pnas.0306948101.
- Yang, W., Di Vizio, D., Kirchner, M., Steen, H., and Freeman, M. R. (2010). Proteome Scale Characterization of Human α-Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes. *Mol. & Cell. Proteomics* 9, 54 LP – 70. Available at: <http://www.mcponline.org/content/9/1/54.abstract>.
- Yang, W., Shi, J., Zhou, Y., Liu, T., Zhan, F., Zhang, K., et al. (2019). Integrating proteomics and transcriptomics for the identification of potential targets in early colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 55, 439–450. doi:10.3892/ijo.2019.4833.
- Yang, X., Guo, Z., Sun, F., Li, W., Alfano, A., Shimelis, H., et al. (2011). Novel membrane-associated androgen receptor splice variant potentiates proliferative and survival responses in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 36152–36160. doi:10.1074/jbc.M111.265124.
- Young, F. B., Butland, S. L., Sanders, S. S., Sutton, L. M., and Hayden, M. R. (2012). Putting proteins in their place: Palmitoylation in Huntington disease and other neuropsychiatric diseases. *Prog. Neurobiol.* 97, 220–238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.002>.
- Yu, J., Chia, J., Canning, C. A., Jones, C. M., Bard, F. A., and Virshup, D. M. (2014). WLS Retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Dev. Cell* 29, 277–291. doi:10.1016/j.devcel.2014.03.016.
- Yudkoff, M., Zaleska, M. M., Nissim, I., Nelson, D., and ErecinAska, M. (1989). Neuronal Glutamine Utilization: Pathways of Nitrogen Transfer studied with [15N]Glutamine. *J. Neurochem.* 53, 632–640. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07380.x>.
- Yue, J., Xie, M., Gou, X., Lee, P., Schneider, M. D., and Wu, X. (2014). Microtubules Regulate Focal Adhesion Dynamics through MAP4K4. *Dev. Cell* 31, 572–585. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.025.
- Zamzow, D. R., Elias, V., Acosta, V. A., Escobedo, E., and Magnusson, K. R. (2019). Higher levels of protein palmitoylation in the frontal cortex across aging were associated with

reference memory and executive function declines. *eNeuro* 6. doi:10.1523/ENEURO.0310-18.2019.

Zaręba-Kozioł, M., Figiel, I., Bartkowiak-Kaczmarek, A., and Włodarczyk, J. (2018). Insights Into Protein S-Palmitoylation in Synaptic Plasticity and Neurological Disorders: Potential and Limitations of Methods for Detection and Analysis. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–18. doi:10.3389/fnmol.2018.00175.

Zhang, P., Culver-Cochran, A., Stevens, S. M., and Liu, B. (2016). Characterization of a SILAC method for proteomic analysis of primary rat microglia. *Proteomics* 16, 1341–1346. doi:10.1002/aur.1474.Replication.

Zhao, L., O'Neill, K., and Diaz Brinton, R. (2005). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res. Rev.* 49, 472–493. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.01.009.

Zheng, H., Pearsall, E. A., Hurst, D. P., Zhang, Y., Chu, J., Zhou, Y., et al. (2012). Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize μ-opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biol.* 13, 6. doi:10.1186/1471-2121-13-6.

12. Material suplementario

Material Suplementario 1. lista completa de proteínas expresadas diferencialmente en la comparación pal_vs_veh

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
P31949	Protein S100-A11 (Calgizzarin) (Metastatic lymph node gene 70 protein) (MLN 70) (Protein S100-C) (S100 calcium-binding protein A11) [Cleaved into: Protein S100-A11, N-terminally processed]	S100A11 MLN70 S100C	Al alta
Q9P2R7	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC 6.2.1.5) (ATP-specific succinyl-CoA synthetase subunit beta) (A-SCS) (Succinyl-CoA synthetase beta-A chain) (SCS-betaA)	SUCLA2	Al alta

Q12904	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1 (Multisynthase complex auxiliary component p43) [Cleaved into: Endothelial monocyte-activating polypeptide 2 (EMAP-2) (Endothelial monocyte-activating polypeptide II) (EMAP-II) (Small inducible cytokine subfamily E member 1)]	AIMP1 EMAP2 SCYE1	Al alta
Q9Y265	RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12) (49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (49 kDa TBP-interacting protein) (54 kDa erythrocyte cytosolic protein) (ECP-54) (INO80 complex subunit H) (Nuclear matrix protein 238) (NMP 238) (Pontin 52) (TIP49a) (TIP60-associated protein 54-alpha) (TAP54-alpha)	RUVBL1 INO80H NMP238 TIP49 TIP49A	Al alta
P61204	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	Al alta
P60484	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.48) (EC 3.1.3.67) (Mutated in multiple advanced cancers 1) (Phosphatase and tensin homolog)	PTEN MMAC1 TEP1	Al alta
Q8NGA1	Olfactory receptor 1M1 (Olfactory receptor 19-6) (OR19-6) (Olfactory receptor OR19-5)	OR1M1	Al alta
P81605	Dermcidin (EC 3.4.-.-) (Preproteolysin) [Cleaved into: Survival-promoting peptide; DCD-1]	DCD AIDD DSEP	Al alta
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2) (Lysosome-associated membrane protein 2) (CD107 antigen-like family member B) (LGP-96) (CD antigen CD107b)	LAMP2	Al alta
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 7.1.1.9) (Cytochrome c oxidase polypeptide II)	MT-CO2 COII COX2 COXII MTCO2	Al alta

Q9BW60	Elongation of very long chain fatty acids protein 1 (EC 2.3.1.199) (3-keto acyl-CoA synthase ELOVL1) (ELOVL fatty acid elongase 1) (ELOVL FA elongase 1) (Very long chain 3-ketoacyl-CoA synthase 1) (Very long chain 3-oxoacyl-CoA synthase 1)	ELOVL1 SSC1 CGI-88	Al alta
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	GNG12	Al alta
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (220 kDa U5 snRNP-specific protein) (PRP8 homolog) (Splicing factor Prp8) (p220)	PRPF8 PRPC8	Al alta
P62851	40S ribosomal protein S25 (Small ribosomal subunit protein eS25)	RPS25	Al alta
P46109	Crk-like protein	CRKL	Al alta
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (EC 7.1.1.2) (Complex I-51kD) (CI-51kD) (NADH dehydrogenase flavoprotein 1) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit)	NDUFV1 UQOR1	Al alta
O14737	Programmed cell death protein 5 (TF-1 cell apoptosis-related protein 19) (Protein TFAR19)	PDCD5 TFAR19	Al alta
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93) (Synaptic glycoprotein SC2) (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (TER)	TECR GPSN2 SC2	Al alta
Q96DG6	Carboxymethylenebutenolidase homolog (EC 3.1---)	CMBL	Al alta
Q92888	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (115 kDa guanine nucleotide exchange factor) (p115-RhoGEF) (p115RhoGEF) (Sub1.5)	ARHGEF1	Al alta
Q9UJU6	Drebrin-like protein (Cervical SH3P7) (Cervical mucin-associated protein) (Drebrin-F) (HPK1-interacting protein of 55 kDa) (HIP-55) (SH3 domain-containing protein 7)	DBNL CMAP SH3P7 PP5423	Al alta

P09913	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT-2) (ISG-54 K) (Interferon-induced 54 kDa protein) (IFI-54K) (P54)	IFIT2 CIG-42 G10P2 IFI54 ISG54	Al alta
P09110	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase) (Peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase)	ACAA1 ACAA PTHIO	Al alta
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 (EC 3.6.4.-) (86 kDa subunit of Ku antigen) (ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2) (ATP-dependent DNA helicase II 80 kDa subunit) (CTC box-binding factor 85 kDa subunit) (CTC85) (CTCBF) (DNA repair protein XRCC5) (Ku80) (Ku86) (Lupus Ku autoantigen protein p86) (Nuclear factor IV) (Thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoicing))	XRCC5 G22P2	Al alta
P12955	Xaa-Pro dipeptidase (X-Pro dipeptidase) (EC 3.4.13.9) (Imidodipeptidase) (Peptidase D) (Proline dipeptidase) (Prolidase)	PEPD PRD	Al alta
Q96Q42	Alsin (Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 6 protein) (Amyotrophic lateral sclerosis 2 protein)	ALS2 ALS2CR6 KIAA1563	A la baja
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5 OK/SW-cl.75	A la baja
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP (EC 2.3.2.27) (Antigen NY-CO-7) (CLL-associated antigen KW-8) (Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) (RING-type E3 ubiquitin transferase CHIP) (STIP1 homology and U box-containing protein 1)	STUB1 CHIP PP1131	A la baja
P55263	Adenosine kinase (AK) (EC 2.7.1.20) (Adenosine 5'-phosphotransferase)	ADK	A la baja

Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6 (Papillary thyroid carcinoma-encoded protein) (Protein H4)	CCDC6 D10S170 TST1	A la baja
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial (ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP) (Oligomycin sensitivity conferral protein) (OSCP)	ATP5PO ATP5O ATPO	A la baja
Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2 (Protein G7b) (Small nuclear ribonuclear protein D homolog) (snRNP core Sm-like protein Sm-x5)	LSM2 C6orf28 G7B	A la baja
Q13561	Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide) (Dynactin complex 50 kDa subunit) (DCTN-50) (p50 dynamitin)	DCTN2 DCTN50	A la baja
Q9P2B4	CTTNBP2 N-terminal-like protein	CTTNBP2NL KIAA1433	A la baja
Q15404	Ras suppressor protein 1 (RSP-1) (Rsu-1)	RSU1 RSP1	A la baja
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2 (Cell cycle progression restoration gene 3 protein) (Dnj3) (Dj3) (HIRA-interacting protein 4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-14)	DNAJA2 CPR3 HIRIP4	A la baja
P16035	Metalloproteinase inhibitor 2 (CSC-21K) (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2) (TIMP-2)	TIMP2	A la baja
Q9NPA8	Transcription and mRNA export factor ENY2 (Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog)	ENY2 DC6	A la baja
P61927	60S ribosomal protein L37 (G1.16) (Large ribosomal subunit protein eL37)	RPL37	A la baja
O95373	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	IPO7 RANBP7	A la baja
Q92890	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) (UB fusion protein 1)	UFD1 UFD1L	A la baja

P84090	Enhancer of rudimentary homolog	ERH	A la baja
P12270	Nucleoprotein TPR (Megator) (NPC-associated intranuclear protein) (Translocated promoter region protein)	TPR	A la baja
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X (EC 3.6.4.13) (CAP-Rf) (DEAD box protein 3, X-chromosomal) (DEAD box, X isoform) (DBX) (Helicase-like protein 2) (HLP2)	DDX3X DBX DDX3	A la baja
O43795	Unconventional myosin-Ib (MYH-1c) (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	MYO1B	A la baja
P61313	60S ribosomal protein L15 (Large ribosomal subunit protein eL15)	RPL15 EC45 TCBAP0781	A la baja
Q14677	Clathrin interactor 1 (Clathrin-interacting protein localized in the trans-Golgi region) (Clint) (Enthoprotin) (Epsin-4) (Epsin-related protein) (EpsinR)	CLINT1 ENTH EPN4 EPNR KIAA0171	A la baja
Q6NYC8	Phostensin (Protein phosphatase 1 F-actin cytoskeleton-targeting subunit) (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 18)	PPP1R18 HKMT1098 KIAA1949	A la baja
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha)	EIF2S1 EIF2A	A la baja
Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (Cytoplasmic dynein intermediate chain 2) (Dynein intermediate chain 2, cytosolic) (DH IC-2)	DYNC1I2 DNCI2 DNCIC2	A la baja
Q9UHB9	Signal recognition particle subunit SRP68 (SRP68) (Signal recognition particle 68 kDa protein)	SRP68	A la baja
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	PFDN2 PFD2 HSPC231	A la baja

P53621	Coatomer subunit alpha (Alpha-coat protein) (Alpha-COP) (HEP-COP) (HEPCOP) [Cleaved into: Xenin (Xenopsin-related peptide); Proxenin]	COPA	A la baja
P53618	Coatomer subunit beta (Beta-coat protein) (Beta-COP)	COPB1 COPB MSTP026	A la baja

Tabla completa de proteínas que fueron expresadas diferencialmente en la comparación de pal_vs_veh con un de FDR <0.1 y p <0.01.

Material Suplementario 2. lista completa de proteínas expresadas diferencialmente en la comparación tip_vs_veh

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
Q16658	Fascin (55 kDa actin-bundling protein) (Singed-like protein) (p55)	FSCN1 FAN1 HSN SNL	Al alta
Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein (FIS1 homolog) (hFis1) (Tetratricopeptide repeat protein 11) (TPR repeat protein 11)	FIS1 TTC11 CGI-135	Al alta
Q9NQC3	Reticulon-4 (Foocen) (Neurite outgrowth inhibitor) (Nogo protein) (Neuroendocrine-specific protein) (NSP) (Neuroendocrine-specific protein C homolog) (RTN-x) (Reticulon-5)	RTN4 KIAA0886 NOGO My043 SP1507	Al alta
O95819	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 (EC 2.7.11.1) (HPK/GCK-like kinase HGK) (MAPK/ERK kinase kinase kinase 4) (MEK)	MAP4K4 HGK KIAA0687 NIK	Al alta

	kinase kinase 4) (MEKKK 4) (Nck-interacting kinase)		
Q4KWH8	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 (EC 3.1.4.11) (Phosphoinositide phospholipase C-eta-1) (Phospholipase C-eta-1) (PLC-eta-1) (Phospholipase C-like protein 3) (PLC-L3)	PLCH1 KIAA1069 PLCL3	Al alta
P63167	Dynein light chain 1, cytoplasmic (8 kDa dynein light chain) (DLC8) (Dynein light chain LC8-type 1) (Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase) (PIN)	DYNLL1 DLC1 DNCL1 DNCLC1 HDLC1	Al alta
O75439	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta (EC 3.4.24.64) (Beta-MPP) (P-52)	PMPCB MPPB	Al alta
P05141	ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2) (ADP,ATP carrier protein, fibroblast isoform) (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2) (Solute carrier family 25 member 5) [Cleaved into: ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed]	SLC25A5 ANT2	Al alta
Q9UHB9	Signal recognition particle subunit SRP68 (SRP68) (Signal recognition particle 68 kDa protein)	SRP68	Al alta
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13 (Required for	DNAJC13 KIAA0678 RME8	Al alta

	receptor-mediated endocytosis 8) (RME-8)		
Q43169	Cytochrome b5 type B (Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane isoform)	CYB5B CYB5M OMB5	Al alta
P58546	Myotrophin (Protein V-1)	MTPN	Al alta
P63096	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 (Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein)	GNAI1	Al alta
Q12904	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1 (Multisynthase complex auxiliary component p43) [Cleaved into: Endothelial monocyte-activating polypeptide 2 (EMAP-2) (Endothelial monocyte-activating polypeptide II) (EMAP-II) (Small inducible cytokine subfamily E member 1)]	AIMP1 EMAP2 SCYE1	Al alta
Q13162	Peroxiredoxin-4 (EC 1.11.1.24) (Antioxidant enzyme AOE372) (AOE37-2) (Peroxiredoxin IV) (Prx-IV) (Thioredoxin peroxidase AO372) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase A0372) (Thioredoxin-dependent peroxiredoxin 4)	PRDX4	Al alta

P21589	5'-nucleotidase (5'-NT) (EC 3.1.3.5) (Ecto-5'-nucleotidase) (CD antigen CD73)	NT5E NT5 NTE	Al alta
O75340	Programmed cell death protein 6 (Apoptosis-linked gene 2 protein homolog) (ALG-2)	PDCD6 ALG2	Al alta
P09914	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT-1) (Interferon-induced 56 kDa protein) (IFI-56K) (P56)	IFIT1 G10P1 IFI56 IFNAI1 ISG56	Al alta
Q14108	Lysosome membrane protein 2 (85 kDa lysosomal membrane sialoglycoprotein) (LGP85) (CD36 antigen-like 2) (Lysosome membrane protein II) (LIMP II) (Scavenger receptor class B member 2) (CD antigen CD36)	SCARB2 CD36L2 LIMP2 LIMPII	Al alta
P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2 (CapZ alpha-2)	CAPZA2	Al alta
Q6IBS0	Twinfilin-2 (A6-related protein) (hA6RP) (Protein tyrosine kinase 9-like) (Twinfilin-1-like protein)	TWF2 PTK9L MSTP011	Al alta
P14174	Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (EC 5.3.2.1) (Glycosylation-inhibiting factor) (GIF) (L-dopachrome isomerase) (L-dopachrome tautomerase) (EC 5.3.3.12) (Phenylpyruvate tautomerase)	MIF GLIF MMIF	Al alta
P60903	Protein S100-A10 (Calpactin I light chain) (Calpactin-1 light	S100A10 ANX2LG CAL1L CLP11	Al alta

	chain) (Cellular ligand of annexin II) (S100 calcium-binding protein A10) (p10 protein) (p11)		
P06703	Protein S100-A6 (Calcyclin) (Growth factor-inducible protein 2A9) (MLN 4) (Prolactin receptor-associated protein) (PRA) (S100 calcium-binding protein A6)	S100A6 CACY	Al alta
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) (EC 5.3.1.9) (Autocrine motility factor) (AMF) (Neuroleukin) (NLK) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phosphohexose isomerase) (PHI) (Sperm antigen 36) (SA-36)	GPI	Al alta
P52594	Arf-GAP domain and FG repeat-containing protein 1 (HIV-1 Rev-binding protein) (Nucleoporin-like protein RIP) (Rev-interacting protein) (Rev/Rex activation domain-binding protein)	AGFG1 HRB RAB RIP	Al alta
Q03518	Antigen peptide transporter 1 (APT1) (ATP-binding cassette sub-family B member 2) (Peptide supply factor 1) (Peptide transporter PSF1) (PSF-1) (Peptide transporter TAP1) (Peptide transporter involved in antigen processing 1) (Really interesting new gene 4 protein)	TAP1 ABCB2 PSF1 RING4 Y3	Al alta

P07355	Annexin A2 (Annexin II) (Annexin-2) (Calpactin I heavy chain) (Calpactin-1 heavy chain) (Chromobindin-8) (Lipocortin II) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV) (Protein I) (p36)	ANXA2 ANX2 ANX2L4 CAL1H LPC2D	Al alta
Q92882	Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1	Al alta
P62851	40S ribosomal protein S25 (Small ribosomal subunit protein eS25)	RPS25	Al alta
O60502	Protein O-GlcNAcase (OGA) (EC 3.2.1.169) (Beta-N-acetylglucosaminidase) (Beta-N-acetylhexosaminidase) (Beta-hexosaminidase) (Meningioma-expressed antigen 5) (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) (N-acetyl-beta-glucosaminidase) (Nuclear cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyltransferase) (NCOAT)	OGA HEXC KIAA0679 MEA5 MGEA5	Al alta
Q9HAY6	Beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.63) (Beta-carotene dioxygenase 1) (Beta-carotene oxygenase 1)	BCO1 BCDO BCDO1 BCMO1	Al alta
P60484	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.48) (EC 3.1.3.67) (Mutated in multiple advanced cancers 1)	PTEN MMAC1 TEP1	Al alta

	(Phosphatase and tensin homolog)		
Q96TA1	Protein Niban 2 (Meg-3) (Melanoma invasion by ERK) (MINERVA) (Niban-like protein 1) (Protein FAM129B)	NIBAN2 C9orf88 FAM129B	Al alta
Q92888	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (115 kDa guanine nucleotide exchange factor) (p115-RhoGEF) (p115RhoGEF) (Sub1.5)	ARHGEF1	Al alta
P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	Al alta
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 (67 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-1) (CK-1) (Hair alpha protein) (Keratin-1) (K1) (Type-II keratin Kb1)	KRT1 KRTA	Al alta
P49902	Cytosolic purine 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Cytosolic 5'-nucleotidase II)	NT5C2 NT5B NT5CP PNT5	Al alta
Q9Y646	Carboxypeptidase Q (EC 3.4.17.-) (Lysosomal dipeptidase) (Plasma glutamate carboxypeptidase)	CPQ LCH1 PGCP	Al alta
P29692	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (Antigen NY-CO-4)	EEF1D EF1D	Al alta
Q8IWB7	WD repeat and FYVE domain-containing protein 1 (FYVE domain-containing protein localized to endosomes 1) (FENS-1) (Phosphoinositide-binding protein 1) (WD40- and FYVE domain-containing	WDFY1 FENS1 KIAA1435 WDF1 ZFYVE17	Al alta

	protein 1) (Zinc finger FYVE domain-containing protein 17)		
Q96DG6	Carboxymethylenebutenolidase homolog (EC 3.1.-.-)	CMBL	Al alta
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F (H2B-clustered histone 18)	H2BC18 HIST2H2BF	Al alta
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 46) (PRP5 homolog)	DDX46 KIAA0801	Al alta
Q9BW60	Elongation of very long chain fatty acids protein 1 (EC 2.3.1.199) (3-keto acyl-CoA synthase ELOVL1) (ELOVL fatty acid elongase 1) (ELOVL FA elongase 1) (Very long chain 3-ketoacyl-CoA synthase 1) (Very long chain 3-oxoacyl-CoA synthase 1)	ELOVL1 SSC1 CGI-88	Al alta
O14879	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT-3) (CIG49) (ISG-60) (Interferon-induced 60 kDa protein) (IFI-60K) (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4) (IFIT-4) (Retinoic acid-induced gene G protein) (P60) (RIG-G)	IFIT3 CIG-49 IFI60 IFIT4 ISG60	Al alta
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 7.1.1.9) (Cytochrome c oxidase polypeptide II)	MT-CO2 COII COX2 COXII MTCO2	Al alta
P19367	Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1) (Brain form hexokinase)	HK1	Al alta

	(Hexokinase type I) (HK I) (Hexokinase-A)		
P09110	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase) (Peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase)	ACAA1 ACAA PTHIO	Al alta
O95497	Pantetheinase (EC 3.5.1.92) (Pantetheine hydrolase) (Tiff66) (Vascular non- inflammatory molecule 1) (Vanin-1)	VNN1	Al alta
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	GNG12	Al alta
P12235	ADP/ATP translocase 1 (ADP, ATP carrier protein 1) (ADP, ATP carrier protein, heart/skeletal muscle isoform T1) (Adenine nucleotide translocator 1) (ANT 1) (Solute carrier family 25 member 4)	SLC25A4 ANT1	Al alta
P62805	Histone H4	H4C1 H4/A H4FA HIST1H4A; H4C2 H4/I H4FI HIST1H4B; H4C3 H4/G H4FG HIST1H4C; H4C4 H4/B H4FB HIST1H4D; H4C5 H4/J H4FJ HIST1H4E; H4C6 H4/C H4FC HIST1H4F; H4C8 H4/H H4FH HIST1H4H; H4C9 H4/M H4FM HIST1H4I; H4C11 H4/E H4FE HIST1H4J; H4C12 H4/D H4FD HIST1H4K; H4C13	Al alta

		H4/K H4FK HIST1H4L; H4C14 H4/N H4F2 H4FN HIST2H4 HIST2H4A; H4C15 H4/O H4FO HIST2H4B; H4- 16 HIST4H4	
O95573	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 (EC 6.2.1.3) (Arachidonate--CoA ligase) (EC 6.2.1.15) (Long-chain acyl-CoA synthetase 3) (LACS 3)	ACSL3 ACS3 FACL3 LACS3	Al alta
O14737	Programmed cell death protein 5 (TF-1 cell apoptosis-related protein 19) (Protein TFAR19)	PDCD5 TFAR19	Al alta
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 (EC 3.6.4.-) (86 kDa subunit of Ku antigen) (ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2) (ATP-dependent DNA helicase II 80 kDa subunit) (CTC box-binding factor 85 kDa subunit) (CTC85) (CTCBF) (DNA repair protein XRCC5) (Ku80) (Ku86) (Lupus Ku autoantigen protein p86) (Nuclear factor IV) (Thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining))	XRCC5 G22P2	Al alta
P09913	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT-2) (ISG-54 K)	IFIT2 CIG-42 G10P2 IFI54 ISG54	Al alta

	(Interferon-induced 54 kDa protein) (IFI-54K) (P54)		
Q96Q42	Alsin (Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 6 protein) (Amyotrophic lateral sclerosis 2 protein)	ALS2 ALS2CR6 KIAA1563	A la baja
P53618	Coatomer subunit beta (Beta-coat protein) (Beta-COP)	COPB1 COPB MSTP026	A la baja
O43294	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (Androgen receptor coactivator 55 kDa protein) (Androgen receptor-associated protein of 55 kDa) (Hydrogen peroxide-inducible clone 5 protein) (Hic-5)	TGFB1I1 ARA55	A la baja
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3)	CHCHD3 MIC19 MINOS3	A la baja
O43795	Unconventional myosin-Ib (MYH-1c) (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	MYO1B	A la baja
Q9NP79	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog (Dopamine-responsive gene 1 protein) (DRG-1) (LYST-interacting protein 5) (LIP5) (SKD1-binding protein 1) (SBP1)	VTA1 C6orf55 HSPC228 My012	A la baja
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP (EC 2.3.2.27) (Antigen NY-CO-7) (CLL-associated	STUB1 CHIP PP1131	A la baja

	antigen KW-8) (Carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) (RING-type E3 ubiquitin transferase CHIP) (STIP1 homology and U box-containing protein 1)		
Q9P2B4	CTTNBP2 N-terminal-like protein	CTTNBP2NL KIAA1433	A la baja
P46459	Vesicle-fusing ATPase (EC 3.6.4.6) (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) (NEM-sensitive fusion protein) (Vesicular-fusion protein NSF)	NSF	A la baja
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Ferritin repressor protein) (Iron regulatory protein 1) (IRP1) (Iron-responsive element-binding protein 1) (IRE-BP 1)	ACO1 IREB1	A la baja
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A (EC 3.6.4.13) (DEAH box protein 9) (DExH-box helicase 9) (Leukophysin) (LKP) (Nuclear DNA helicase II) (NDH II) (RNA helicase A)	DHX9 DDX9 LKP NDH2	A la baja
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 (Scaffold-attachment factor A2) (SAF-A2)	HNRNPUL2 HNRPUL2	A la baja
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 14) (Ubiquitin thioesterase 14)	USP14 TGT	A la baja

	(Ubiquitin-specific-processing protease 14)		
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (eIF-4-gamma 1) (eIF-4G 1) (eIF-4G1) (p220)	EIF4G1 EIF4F EIF4G EIF4GI	A la baja
Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2 (PON 2) (EC 3.1.1.2) (EC 3.1.1.81) (Aromatic esterase 2) (A-esterase 2) (Serum aryldialkylphosphatase 2)	PON2	A la baja
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein (Ran-binding protein 1) (RanBP1)	RANBP1	A la baja
P22061	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT) (EC 2.1.1.77) (L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase) (Protein L-isoaspartyl/D-aspartyl methyltransferase) (Protein-beta-aspartate methyltransferase)	PCMT1	A la baja
P16035	Metalloproteinase inhibitor 2 (CSC-21K) (Tissue inhibitor of metalloproteinases 2) (TIMP-2)	TIMP2	A la baja
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2 (Cell cycle progression restoration gene 3 protein) (Dnj3) (Dj3) (HIRA-interacting protein 4) (Renal	DNAJA2 CPR3 HIRIP4	A la baja

	carcinoma antigen NY-REN-14)		
Q9Y333	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2 (Protein G7b) (Small nuclear ribonuclear protein D homolog) (snRNP core Sm-like protein Sm-x5)	LSM2 C6orf28 G7B	A la baja
P55263	Adenosine kinase (AK) (EC 2.7.1.20) (Adenosine 5'-phosphotransferase)	ADK	A la baja
Q12792	Twinfilin-1 (Protein A6) (Protein tyrosine kinase 9)	TWF1 PTK9	A la baja
P83731	60S ribosomal protein L24 (60S ribosomal protein L30) (Large ribosomal subunit protein eL24)	RPL24	A la baja
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X (EC 3.6.4.13) (CAP-Rf) (DEAD box protein 3, X-chromosomal) (DEAD box, X isoform) (DBX) (Helicase-like protein 2) (HLP2)	DDX3X DBX DDX3	A la baja
P43243	Matrin-3	MATR3 KIAA0723	A la baja
O00629	Importin subunit alpha-3 (Importin alpha Q1) (Qip1) (Karyopherin subunit alpha-4)	KPNA4 QIP1	A la baja
Q9NTK5	Obg-like ATPase 1 (DNA damage-regulated overexpressed in cancer 45) (DOC45) (GTP-binding protein 9)	OLA1 GTPBP9 PRO2455 PTD004	A la baja
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1 LLH PLOD	A la baja

	(EC 1.14.11.4) (Lysyl hydroxylase 1) (LH1)		
Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3 (EC 3.4.14.4) (Dipeptidyl aminopeptidase III) (Dipeptidyl arylamidase III) (Dipeptidyl peptidase III) (DPP III) (Enkephalinase B)	DPP3	A la baja
Q14194	Dihydropyrimidinase-related protein 1 (DRP-1) (Collapsin response mediator protein 1) (CRMP-1) (Inactive dihydropyrimidinase) (Unc-33-like phosphoprotein 3) (ULIP-3)	CRMP1 DPYSL1 ULIP3	A la baja
Q92896	Golgi apparatus protein 1 (CFR-1) (Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) (E-selectin ligand 1) (ESL-1) (Golgi sialoglycoprotein MG-160)	GLG1 CFR1 ESL1 MG160	A la baja
P61313	60S ribosomal protein L15 (Large ribosomal subunit protein eL15)	RPL15 EC45 TCBAP0781	A la baja
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	A la baja
Q9NYF8	Bcl-2-associated transcription factor 1 (Btf) (BCLAF1 and THRAP3 family member 1)	BCLAF1 BTF KIAA0164	A la baja
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 (26S proteasome regulatory subunit RPN9) (26S proteasome regulatory subunit S11) (26S	PSMD13	A la baja

	proteasome regulatory subunit p40.5)		
Q5JPE7	Nodal modulator 2 (pM5 protein 2)	NOMO2	A la baja
Q92890	Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) (UB fusion protein 1)	UFD1 UFD1L	A la baja
Q9Y2S6	Translation machinery-associated protein 7 (Coiled-coil domain-containing protein 72)	TMA7 CCDC72 HSPC016 HSPC330	A la baja
Q13510	Acid ceramidase (AC) (ACDase) (Acid CDase) (EC 3.5.1.23) (Acylsphingosine deacylase) (N-acylethanolamine hydrolase ASAHI) (EC 3.5.1.-) (N-acylsphingosine amidohydrolase) (Putative 32 kDa heart protein) (PHP32) [Cleaved into: Acid ceramidase subunit alpha; Acid ceramidase subunit beta]	ASAHI ASAHI HSD-33 HSD33	A la baja
P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (Complex III subunit 7) (Complex III subunit VII) (QP-C) (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein)	UQCRCB UQBP	A la baja
P50570	Dynamin-2 (EC 3.6.5.5)	DNM2 DYN2	A la baja
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 2.3.2.26) (ARF-	HUWE1 KIAA0312 KIAA1578 UREB1 HSPC272	A la baja

	binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (HECT-type E3 ubiquitin transferase HUWE1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of UREB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)		
Q92598	Heat shock protein 105 kDa (Antigen NY-CO-25) (Heat shock 110 kDa protein)	HSPH1 HSP105 HSP110 KIAA0201	A la baja
O00244	Copper transport protein ATOX1 (Metal transport protein ATX1)	ATOX1 HAH1	A la baja
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (26S proteasome regulatory subunit RPN6) (26S proteasome regulatory subunit S9) (26S proteasome regulatory subunit p44.5)	PSMD11	A la baja
Q8WUP2	Filamin-binding LIM protein 1 (FBLP-1) (Migfilin) (Mitogen-inducible 2-interacting protein) (MIG2-interacting protein)	FBLIM1 FBLP1	A la baja
P25786	Proteasome subunit alpha type-1 (EC 3.4.25.1) (30 kDa prosomal protein) (PROS-30) (Macropain subunit C2) (Multicatalytic endopeptidase	PSMA1 HC2 NU PROS30 PSC2	A la baja

	complex subunit C2) (Proteasome component C2) (Proteasome nu chain)		
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) (PAI-1) (Endothelial plasminogen activator inhibitor) (Serpine E1)	SERPINE1 PAI1 PLANH1	A la baja
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) (Nucleolin-like protein mcs94-1) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed]	HNRNPF HNRPF	A la baja
Q9UBR2	Cathepsin Z (EC 3.4.18.1) (Cathepsin P) (Cathepsin X)	CTSZ	A la baja
O43615	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIMM44 MIMT44 TIM44	A la baja
P60468	Protein transport protein Sec61 subunit beta	SEC61B	A la baja
P61513	60S ribosomal protein L37a (Large ribosomal subunit protein eL43)	RPL37A	A la baja
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20) (Acid maltase) (Aglucosidase alfa) [Cleaved into: 76 kDa lysosomal alpha-glucosidase; 70 kDa lysosomal alpha-glucosidase]	GAA	A la baja
P42766	60S ribosomal protein L35 (Large ribosomal subunit protein uL29)	RPL35	A la baja

P12270	Nucleoprotein TPR (Megator) (NPC-associated intranuclear protein) (Translocated promoter region protein)	TPR	A la baja
Q15404	Ras suppressor protein 1 (RSP-1) (Rsu-1)	RSU1 RSP1	A la baja
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha)	EIF2S1 EIF2A	A la baja
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial (ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP) (Oligomycin sensitivity conferral protein) (OSCP)	ATP5PO ATP5O ATPO	A la baja
Q15121	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 (15 kDa phosphoprotein enriched in astrocytes) (Phosphoprotein enriched in diabetes) (PED)	PEA15	A la baja
Q14677	Clathrin interactor 1 (Clathrin-interacting protein localized in the trans-Golgi region) (Clint) (Enthoprotin) (Epsin-4) (Epsin-related protein) (EpsinR)	CLINT1 ENTH EPN4 EPNR KIAA0171	A la baja
Q99426	Tubulin-folding cofactor B (Cytoskeleton-associated protein 1) (Cytoskeleton-associated protein CKAP1) (Tubulin-specific chaperone B)	TBCB CG22 CKAP1	A la baja

Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1 (Epithelial protein lost in neoplasm)	LIMA1 EPLIN SREBP3 PP624	A la baja
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 (Kappa-actin)	ACTBL2	A la baja
P83916	Chromobox protein homolog 1 (HP1Hsbeta) (Heterochromatin protein 1 homolog beta) (HP1 beta) (Heterochromatin protein p25) (M31) (Modifier 1 protein) (p25beta)	CBX1 CBX	A la baja
P52943	Cysteine-rich protein 2 (CRP-2) (Protein ESP1)	CRIP2 CRP2	A la baja
Q14192	Four and a half LIM domains protein 2 (FHL-2) (LIM domain protein DRAL) (Skeletal muscle LIM-protein 3) (SLIM-3)	FHL2 DRAL SLIM3	A la baja
Q9UKY7	Protein CDV3 homolog	CDV3 H41	A la baja
Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (Cytoplasmic dynein intermediate chain 2) (Dynein intermediate chain 2, cytosolic) (DH IC-2)	DYNC1I2 DNCI2 DNCIC2	A la baja
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (57 kDa RNA-binding protein PPTB-1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I)	PTBP1 PTB	A la baja
O60749	Sorting nexin-2 (Transformation-related gene 9 protein) (TRG-9)	SNX2 TRG9	A la baja

Tabla completa de proteínas que fueron expresadas diferencialmente en la comparación de tip_vs_veh con un de FDR <0.1 y p <0.01.

Material Suplementario 3. lista completa de proteínas expresadas diferencialmente en la comparación tip_vs_pal

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
O94905	Erlin-2 (Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2) (Stomatin-prohibitin-flotillin-HflC/K domain-containing protein 2) (SPFH domain-containing protein 2)	ERLIN2 C8orf2 SPFH2 UNQ2441/PRO5003/PRO9924	Al alta
P62829	60S ribosomal protein L23 (60S ribosomal protein L17) (Large ribosomal subunit protein uL14)	RPL23	Al alta
Q6NYC8	Phostensin (Protein phosphatase 1 F-actin cytoskeleton-targeting subunit) (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 18)	PPP1R18 HKMT1098 KIAA1949	Al alta
O75340	Programmed cell death protein 6 (Apoptosis-linked gene 2 protein homolog) (ALG-2)	PDCD6 ALG2	Al alta
P20290	Transcription factor BTF3 (Nascent polypeptide-associated complex subunit beta) (NAC-beta) (RNA polymerase B transcription factor 3)	BTF3 NACB OK/SW-cl.8	Al alta
Q9UK76	Jupiter microtubule associated homolog 1 (Androgen-regulated	JPT1 ARM2 HN1	Al alta

	protein 2) (Hematological and neurological expressed 1 protein) [Cleaved into: Jupiter microtubule associated homolog 1, N-terminally processed]		
P53992	Protein transport protein Sec24C (SEC24-related protein C)	SEC24C KIAA0079	Al alta
P07305	Histone H1.0 (Histone H1') (Histone H1(0)) [Cleaved into: Histone H1.0, N-terminally processed]	H1-0 H1F0 H1FV	Al alta
Q92882	Osteoclast-stimulating factor 1	OSTF1	Al alta
P28062	Proteasome subunit beta type-8 (EC 3.4.25.1) (Low molecular mass protein 7) (Macropain subunit C13) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C13) (Proteasome component C13) (Proteasome subunit beta-5i) (Really interesting new gene 10 protein)	PSMB8 LMP7 PSMB5i RING10 Y2	Al alta
P27708	CAD protein [Includes: Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.5.5); Aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2); Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)]	CAD	Al alta
Q13561	Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide) (Dynactin complex 50 kDa subunit) (DCTN-50) (p50 dynamitin)	DCTN2 DCTN50	Al alta
Q9UHB9	Signal recognition particle subunit SRP68 (SRP68) (Signal recognition particle 68 kDa protein)	SRP68	Al alta
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B)	HNRNPA B ABBP1 HNRNPA	Al alta

	(APOBEC1-binding protein 1) (ABBP-1)		
Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6 (Papillary thyroid carcinoma-encoded protein) (Protein H4)	CCDC6 D10S170 TST1	Al alta
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5 OK/SW-cl.75	Al alta
Q02750	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP kinase kinase 1) (MAPKK 1) (MKK1) (EC 2.7.12.2) (ERK activator kinase 1) (MAPK/ERK kinase 1) (MEK 1)	MAP2K1 MEK1 PRKMK1	Al alta
P12955	Xaa-Pro dipeptidase (X-Pro dipeptidase) (EC 3.4.13.9) (Imidodipeptidase) (Peptidase D) (Proline dipeptidase) (Prolidase)	PEPD PRD	A la baja
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3)	CHCHD3 MIC19 MINOS3	A la baja
Q15165	Serum paraoxonase/arylesterase 2 (PON 2) (EC 3.1.1.2) (EC 3.1.1.81) (Aromatic esterase 2) (A-esterase 2) (Serum aryldialkylphosphatase 2)	PON2	A la baja
Q9UJU6	Drebrin-like protein (Cervical SH3P7) (Cervical mucin-associated protein) (Drebrin-F) (HPK1-interacting protein of 55 kDa) (HIP-55) (SH3 domain-containing protein 7)	DBNL CMAP SH3P7 PP5423	A la baja
O43294	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (Androgen receptor coactivator 55 kDa protein) (Androgen receptor-associated protein)	TGFB1I1 ARA55	A la baja

	of 55 kDa) (Hydrogen peroxide-inducible clone 5 protein) (Hic-5)		
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) (Ferritin repressor protein) (Iron regulatory protein 1) (IRP1) (Iron-responsive element-binding protein 1) (IRE-BP 1)	ACO1 IREB1	A la baja
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93) (Synaptic glycoprotein SC2) (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (TER)	TECR GPSN2 SC2	A la baja
P53618	Coatomer subunit beta (Beta-coat protein) (Beta-COP)	COPB1 COPB MSTP026	A la baja
O43615	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIMM44 MIMT44 TIM44	A la baja
Q12792	Twinfilin-1 (Protein A6) (Protein tyrosine kinase 9)	TWF1 PTK9	A la baja
P14927	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (Complex III subunit 7) (Complex III subunit VII) (QP-C) (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein)	UQCRB UQBP	A la baja
Q9NY33	Dipeptidyl peptidase 3 (EC 3.4.14.4) (Dipeptidyl aminopeptidase III) (Dipeptidyl arylamidase III) (Dipeptidyl peptidase III) (DPP III) (Enkephalinase B)	DPP3	A la baja
P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 14) (Ubiquitin thioesterase 14) (Ubiquitin-specific-processing protease 14)	USP14 TGT	A la baja

Q9NTK5	Obg-like ATPase 1 (DNA damage-regulated overexpressed in cancer 45) (DOC45) (GTP-binding protein 9)	OLA1 GTPBP9 PRO2455 PTD004	A la baja
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	A la baja
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma (Thymopoietin, isoforms beta/gamma) (TP beta/gamma) (Thymopoietin-related peptide isoforms beta/gamma) (TPRP isoforms beta/gamma) [Cleaved into: Thymopoietin (TP) (Splenin); Thymopentin (TP5)]	TMPO LAP2	A la baja
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase (EC 3.2.1.20) (Acid maltase) (Aglucosidase alfa) [Cleaved into: 76 kDa lysosomal alpha-glucosidase; 70 kDa lysosomal alpha-glucosidase]	GAA	A la baja
O95336	6-phosphogluconolactonase (6PGL) (EC 3.1.1.31)	PGLS	A la baja
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) (Nucleolin-like protein mcs94-1) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed]	HNRNPF HNRPF	A la baja
O76094	Signal recognition particle subunit SRP72 (SRP72) (Signal recognition particle 72 kDa protein)	SRP72	A la baja
Q5JPE7	Nodal modulator 2 (pM5 protein 2)	NOMO2	A la baja
P83916	Chromobox protein homolog 1 (HP1Hsbeta) (Heterochromatin protein 1 homolog beta) (HP1 beta)	CBX1 CBX	A la baja

	(Heterochromatin protein p25) (M31) (Modifier 1 protein) (p25beta)		
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (26S proteasome regulatory subunit RPN6) (26S proteasome regulatory subunit S9) (26S proteasome regulatory subunit p44.5)	PSMD11	A la baja
Q15046	Lysine-tRNA ligase (EC 2.7.7.-) (EC 6.1.1.6) (Lysyl-tRNA synthetase) (LysRS)	KARS1 KARS KIAA0070	A la baja
O43795	Unconventional myosin-Ib (MYH-1c) (Myosin I alpha) (MMI-alpha) (MMIa)	MYO1B	A la baja
Q9BZL1	Ubiquitin-like protein 5	UBL5	A la baja
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.6) (Glyoxalase II) (Glx II)	HAGH GLO2 HAGH1	A la baja
P52943	Cysteine-rich protein 2 (CRP-2) (Protein ESP1)	CRIP2 CRP2	A la baja

Tabla completa de proteínas que fueron expresadas diferencialmente en la comparación de tip_vs_pal con un de FDR <0.1.

Material suplementario 4. lista completa de las proteínas que fueron únicas de la comparación de pal_vs_veh

Entry	Nombre de la proteína en Uniprot	Nombre de genes	Expresión de las proteínas
P31949	Protein S100-A11 (Calgizzarin) (Metastatic lymph node gene 70 protein) (MLN 70) (Protein S100-C)	S100A11 MLN70 S100C	Al alta

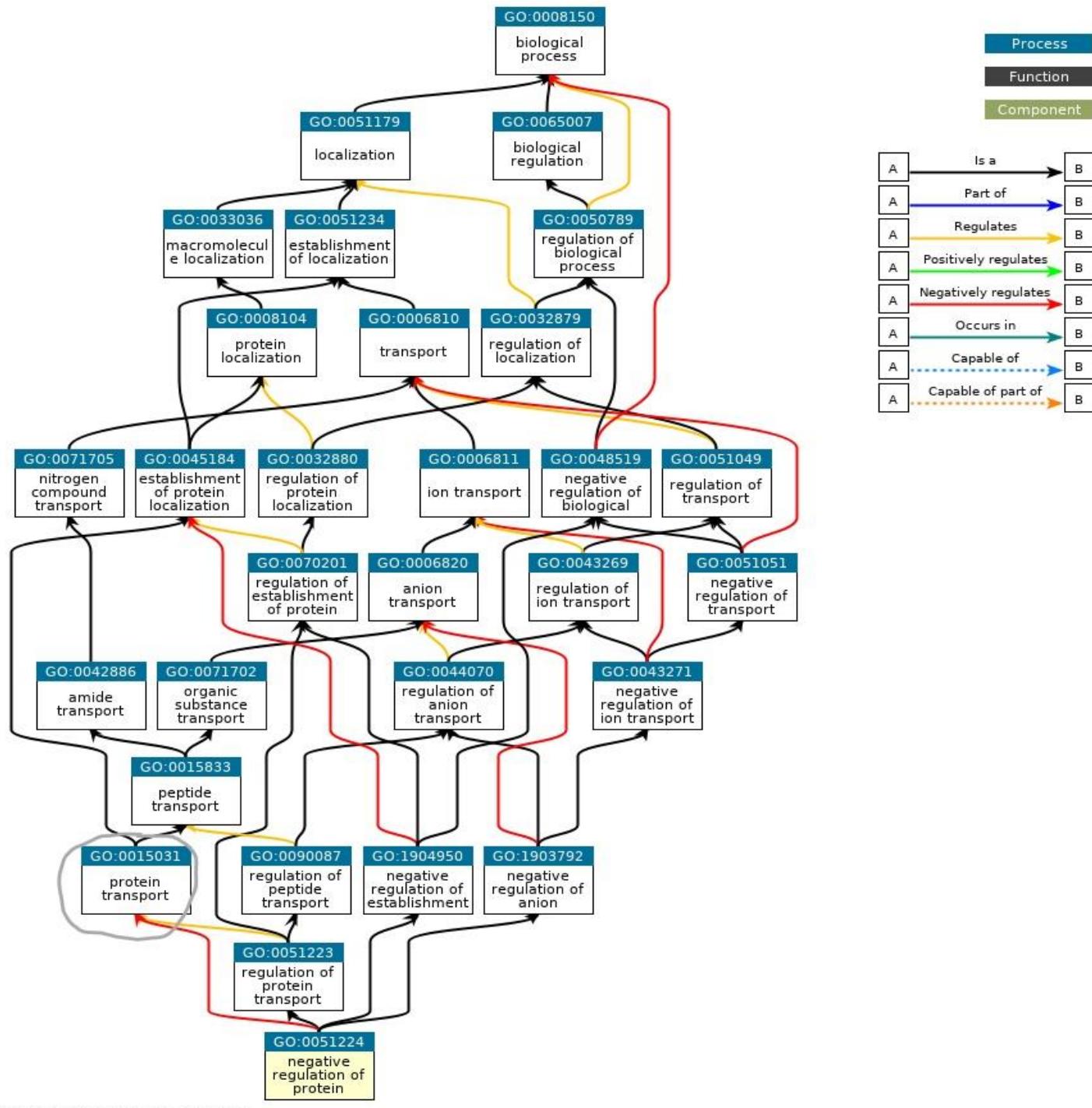
	(S100 calcium-binding protein A11) [Cleaved into: Protein S100-A11, N-terminally processed]		
Q9P2R7	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC 6.2.1.5) (ATP-specific succinyl-CoA synthetase subunit beta) (A-SCS) (Succinyl-CoA synthetase beta-A chain) (SCS-betaA)	SUCLA2	Al alta
Q9Y265	RuvB-like 1 (EC 3.6.4.12) (49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein) (49 kDa TBP-interacting protein) (54 kDa erythrocyte cytosolic protein) (ECP-54) (INO80 complex subunit H) (Nuclear matrix protein 238) (NMP 238) (Pontin 52) (TIP49a) (TIP60-associated protein 54-alpha) (TAP54-alpha)	RUVBL1 INO80H NMP238 TIP49 TIP49A	Al alta
P61204	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	Al alta
Q8NGA1	Olfactory receptor 1M1 (Olfactory receptor 19-6) (OR19-6) (Olfactory receptor OR19-5)	OR1M1	Al alta
P81605	Dermcidin (EC 3.4.--) (Preproteolysin) [Cleaved into: Survival-promoting peptide; DCD-1]	DCD AIDD DSEP	Al alta
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP-2) (Lysosome-associated membrane protein 2) (CD107 antigen-like family member B) (LGP-96) (CD antigen CD107b)	LAMP2	Al alta
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (220 kDa U5 snRNP-specific protein) (PRP8 homolog) (Splicing factor Prp8) (p220)	PRPF8 PRPC8	Al alta
P46109	Crk-like protein	CRKL	Al alta
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial (EC 7.1.1.2) (Complex I-51kD) (CI-51kD) (NADH dehydrogenase flavoprotein 1) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit)	NDUFV1 UQOR1	Al alta

Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93) (Synaptic glycoprotein SC2) (Trans-2,3-enoyl-CoA reductase) (TER)	TECR GPSN2 SC2	Al alta
Q9UJU6	Drebrin-like protein (Cervical SH3P7) (Cervical mucin-associated protein) (Drebrin-F) (HPK1-interacting protein of 55 kDa) (HIP-55) (SH3 domain-containing protein 7)	DBNL CMAP SH3P7 PP5423	Al alta
P12955	Xaa-Pro dipeptidase (X-Pro dipeptidase) (EC 3.4.13.9) (Imidodipeptidase) (Peptidase D) (Proline dipeptidase) (Prolidase)	PEPD PRD	Al alta
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF4G 2) (eIF4G 2) (Death-associated protein 5) (DAP-5) (p97)	EIF4G2 DAP5 OK/SW-cl.75	A la baja
Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6 (Papillary thyroid carcinoma-encoded protein) (Protein H4)	CCDC6 D10S170 TST1	A la baja
Q13561	Dynactin subunit 2 (50 kDa dynein-associated polypeptide) (Dynactin complex 50 kDa subunit) (DCTN-50) (p50 dynamitin)	DCTN2 DCTN50	A la baja
Q9NPA8	Transcription and mRNA export factor ENY2 (Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog)	ENY2 DC6	A la baja
P61927	60S ribosomal protein L37 (G1.16) (Large ribosomal subunit protein eL37)	RPL37	A la baja
O95373	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7) (RanBP7)	IPO7 RANBP7	A la baja
P84090	Enhancer of rudimentary homolog	ERH	A la baja
Q6NYC8	Phostensin (Protein phosphatase 1 F-actin cytoskeleton-targeting subunit) (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 18)	PPP1R18 HKMT1098 KIAA1949	A la baja

Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	PFDN2 PFD2 HSPC231	A la baja
P53621	Coatomer subunit alpha (Alpha-coat protein) (Alpha-COP) (HEP-COP) (HEPCOP) [Cleaved into: Xenin (Xenopsin-related peptide); Proxenin]	COPA	A la baja

Lista completa de proteínas únicamente en la comparación de tip contra pal

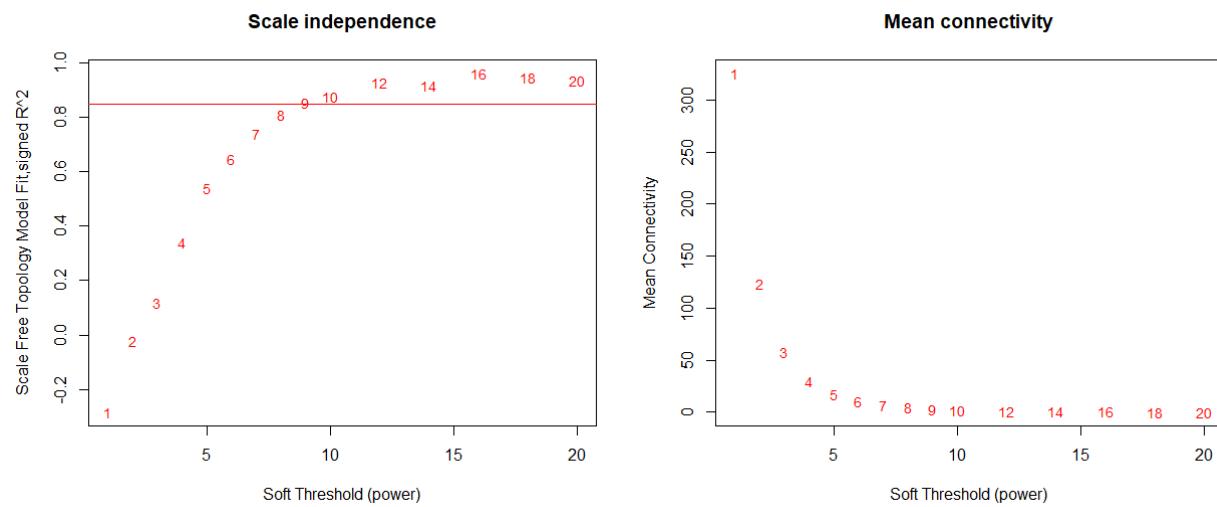
Material suplementario 5. Figura de GO Slim sobre la regulación del transporte de proteínas



QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>

GOSlim relaciona a términos de regulación negativa de proteínas y rastreando los efectos del transporte de proteínas

Material suplementario 6.



SFT usado en el análisis WGCNA para generar los clústers de proteínas.

Material suplementario 7.

mcodeCluster	Del nodo	nombre	Nodo perteneciente al módulo (en inglés)	Nombre del nodo	Al nodo
12	O75340	PDCD6 ALG2	turquoise	O75340	O75340
12	P51571	SSR4 TRAPD	turquoise	P51571	P51571
12	P13861	PRKAR2A PKR2 PRKAR2	turquoise	P13861	
11	Q9NY33	DPP3	turquoise	Q9NY33	Q9NY33
11	O43294	TGFB1II ARA55	turquoise	O43294	

13		PLCH1 KIAA1069 PLCL3	red	Q4KWH8	Q4KWH8
13	Q9BZK7	TBL1XR1 IRA1 TBLR1	red	Q9BZK7	Q9BZK7
13	P49023	PXN	red	P49023	
4		ALS2 ALS2CR6 KIAA1563	red	Q96Q42	Q96Q42
6	P55263	ADK	red	P55263	P55263
6	O95373	IPO7 RANBP7	red	O95373	O95373
14	P61313	RPL15 EC45 TCBAP0781	red	P61313	P61313
14	P47755	CAPZA2	red	P47755	
4	O60884	DNAJA2 CPR3 HIRIP4	red	O60884	O60884
5		CHCHD3 MIC19 MINOS3	turquoise	Q9NX63	Q9NX63
5	P10253	GAA	turquoise	P10253	P10253
11	Q9NTK5	OLA1 GTPBP9 PRO2455 PTD004	turquoise	Q9NTK5	Q9NTK5
8		EIF3L EIF3EIP EIF3S6IP	turquoise	Q9Y262	Q9Y262

		HSPC021 HSPC025 MSTP005			
8	P84157	MXRA7	turquoise	P84157	P84157
8	P13611	VCAN CSPG2	turquoise	P13611	P13611
8	P09960	LTA4H LTA4	turquoise	P09960	
4	P16035	TIMP2	red	P16035	P16035
6	P61204	ARF3	red	P61204	P61204
14	O43795	MYO1B	red	O43795	O43795
5	Q12792	TWF1 PTK9	turquoise	Q12792	Q12792
5	P21399	ACO1 IREB1	turquoise	P21399	P21399
4	P60484	PTEN MMAC1 TEP1	red	P60484	P60484
6	Q92890	UFD1 UFD1L	red	Q92890	Q92890
6		STUB1 CHIP PP1131	red	Q9UNE7	Q9UNE7
2	P63173	RPL38	pink	P63173	P63173
2	Q9BR76	CORO1B	pink	Q9BR76	Q9BR76
4	O00571	DDX3X DBX DDX3	red	O00571	O00571
2	P08708	RPS17 RPS17L	pink	P08708	P08708

2	P37837	TALDO1 TAL TALDO TALDOR	pink	P37837	P37837
2	P49773	HINT1 HINT PKCI1 PRKCNH1	pink	P49773	P49773
2	P23396	RPS3 OK/SW- cl.26	pink	P23396	P23396
2	P23381	WARS1 IFI53 WARS WRS	pink	P23381	P23381
2	P30086	PEBP1 PBP PEBP	pink	P30086	P30086
2	P07951	TPM2 TMSB	pink	P07951	P07951
2	P26038	MSN	pink	P26038	P26038
2	P13639	EEF2 EF2	pink	P13639	P13639
1		ART4 DO DOK1	turquoise	Q93070	Q93070
1	O95819	MAP4K4 HGK KIAA0687 NIK	turquoise	O95819	O95819
10		PFDN1 PFD1	turquoise	O60925	O60925
1	P49902	NT5C2 NT5B NT5CP PNT5	turquoise	P49902	P49902
1	P18065	IGFBP2 BP2 IBP2	turquoise	P18065	P18065

1	Q7L014	DDX46 KIAA0801	turquoise	Q7L014	Q7L014
7	P36507	MAP2K2 MEK2 MKK2 PRKMK2	pink	P36507	P36507
3	Q9Y646	CPQ LCH1 PGCP	pink	Q9Y646	Q9Y646
1	O95497	VNN1	turquoise	O95497	O95497
7	Q6IBS0	TWF2 PTK9L MSTP011	turquoise	Q6IBS0	Q6IBS0
1	P05413	FABP3 FABP11 MDGI	turquoise	P05413	P05413
1	P62244	RPS15A OK/SW-cl.82	turquoise	P62244	P62244
1	Q9P0K7	RAI14 KIAA1334 NORPEG	turquoise	Q9P0K7	Q9P0K7
1	Q9NVD7	PARVA MXRA2	turquoise	Q9NVD7	Q9NVD7
1	P53985	SLC16A1 MCT1	turquoise	P53985	P53985
1	P32969	RPL9 OK/SW- cl.103; RPL9P7; RPL9P8; RPL9P9	turquoise	P32969	P32969

7	P05121	SERPINE1 PAI1 PLANH1	red	P05121	P05121
1	P30040	ERP29 C12orf8 ERP28	turquoise	P30040	P30040
1	P49327	FASN FAS	turquoise	P49327	P49327
1	O00231	PSMD11	turquoise	O00231	O00231
1	P39687	ANP32A C15orf1 LANP MAPM PHAP1	turquoise	P39687	P39687
1	B5ME19	EIF3CL	turquoise	B5ME19	B5ME19
2	P27635	RPL10 DXS648E QM	turquoise	P27635	P27635
10	Q07666	KHDRBS1 SAM68	turquoise	Q07666	Q07666
2	P49257	LMAN1 ERGIC53 F5F8D	turquoise	P49257	P49257
1	P62195	PSMC5 SUG1	turquoise	P62195	P62195
2	O00159	MYO1C	turquoise	O00159	O00159
1	P12235	SLC25A4 ANT1	turquoise	P12235	P12235
1	P24821	TNC HXB	turquoise	P24821	P24821
1	P11766	ADH5 ADHX FDH	turquoise	P11766	P11766

7	Q04637	EIF4G1 EIF4F EIF4G EIF4GI	turquoise	Q04637	Q04637
1	Q92499	DDX1	turquoise	Q92499	Q92499
10	P15559	NQO1 DIA4 NMOR1	turquoise	P15559	P15559
1	O14974	PPP1R12A MBS MYPT1	turquoise	O14974	O14974
1	P07737	PFN1	turquoise	P07737	P07737
2	Q16527	CSRP2 LMO5 SMLIM	turquoise	Q16527	Q16527
1	Q14247	CTTN EMS1	turquoise	Q14247	Q14247
1	P29692	EEF1D EF1D	turquoise	P29692	P29692
7	Q9Y617	PSAT1 PSA	pink	Q9Y617	Q9Y617
9	Q00341	HDLBP HBP VGL	turquoise	Q00341	Q00341
9	P14136	GFAP	turquoise	P14136	P14136
2	Q99497	PARK7	turquoise	Q99497	Q99497
1	P27348	YWHAQ	turquoise	P27348	P27348
1	P23528	CFL1 CFL	turquoise	P23528	P23528
1	Q06830	PRDX1 PAGA PAGB TDPX2	turquoise	Q06830	Q06830
1	P62258	YWHAE	turquoise	P62258	P62258

3	P50395	GDI2 RABGDIB	turquoise	P50395	P50395
1	P07195	LDHB	turquoise	P07195	P07195
3	P13667	PDIA4 ERP70 ERP72	turquoise	P13667	P13667
1	P55072	VCP	turquoise	P55072	P55072
1	O75083	WDR1	turquoise	O75083	O75083
1	P68104	EEF1A1 EEF1A EF1A LENG7	turquoise	P68104	P68104
9	P63104	YWHAZ	turquoise	P63104	P63104
3	P30101	PDIA3 ERP57 ERP60 GRP58	turquoise	P30101	P30101
2	Q14195	DPYSL3 CRMP4 DRP3 ULIP ULIP1	turquoise	Q14195	Q14195
1	Q13509	TUBB3 TUBB4	turquoise	Q13509	Q13509
1	P07900	HSP90AA1 HSP90A HSPC1 HSPCA	turquoise	P07900	P07900
7	P14625	HSP90B1 GRP94 TRA1	turquoise	P14625	P14625
1	P07437	TUBB TUBB5 OK/SW-cl.56	turquoise	P07437	P07437

1	Q71U36	TUBA1A TUBA3	turquoise	Q71U36	Q71U36
1	P63261	ACTG1 ACTG	turquoise	P63261	
3	P09913	IFIT2 CIG-42 G10P2 IFI54 ISG54	turquoise	P09913	P09913
7	Q9UBI6	GNG12	turquoise	Q9UBI6	Q9UBI6
3	O14879	IFIT3 CIG-49 IFI60 IFIT4 ISG60	turquoise	O14879	O14879
1	P09211	GSTP1 FAEES3 GST3	turquoise	P09211	P09211
1	O14950	MYL12B MRLC2 MYLC2B	turquoise	O14950	O14950
7	P11021	HSPA5 GRP78	turquoise	P11021	P11021
3	P04406	GAPDH GAPD CDABP0047 OK/SW-cl.12	turquoise	P04406	P04406
1	P11142	HSPA8 HSC70 HSP73 HSPA10	turquoise	P11142	P11142

Lista completa de los nodos que pasaron el filtro de peso por MCODE en Cytoscape 3.8.0, los cuales representan a las proteínas hub obtenidas en este estudio y que se relacionaron significativamente en cambios dados por tratamiento.