



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

*Efecto de una dieta hiperlipídica e hipercalórica
sobre la expresión génica de RAR α y RXR α en
tejido hepático en un modelo animal.*

T E S I S
QUE PARA OBTNER EL TITULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A
Itzel Ivonn López Tenorio

Bajo la Dirección de:

Director de Tesis: Dr. Aarón Domínguez López

Asesor Interno: M.C. Raúl Zavala Chavero



Mayo

2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis Padres Bertha Tenorio Jiménez y Victor López Hernández, que siempre han estado ahí para apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida, ellos me han hecho reír y me han secado las lagrimas, me han abrazado confortablemente, me han visto triunfar y también me han visto caer, me han llevado a mantenerme fuerte, porque es una promesa, que en ellos tendré los mejores amigos para siempre. Y lo más importante, que gracias a ellos soy la persona capaz y de la cual se sienten orgullosos.

A mis hermanos Lucina, Victoria, Victor y Karen por darme consejos, apoyarme en todo momento y quererme tanto, además de ser un aliciente en mi vida, siempre ayudándome y dándome un espacio importante en su corazón.

A Jesús F. Mondragón por haber compartido más de 5 años de su vida conmigo, agradeciéndole el tiempo que me ha dedicado, así como las alegrías y tristezas de las cuales he aprendido además de brindarme su corazón y amor.

A Pili García por ser mi amiga de toda la carrera, con la cual he compartido momentos felices y difíciles por escucharme siempre, y en general a todos los amigos que conocí en la Fes Zaragoza, los cuales formaron parte de mi desarrollo personal y académico.

A la Dra. Grisel Olivares Moreno que además de ser una gran maestra fue una gran amiga, consejera y una persona maravillosa la cual doy gracias a dios por haberla puesto en mi camino y aunque me hubiera encantado que estuviera en este momento conmigo estoy segura que ella desde arriba se siente muy orgullosa de mi, me aportó gran conocimiento y dedicación para mi formación y gracias a sus alicientes puedo decir que logre terminar la tesis.

A la Dra. Natalia Garay Lugo que fue mi revisora, amiga y maestra, me apoyo en todo momento brindándome su confianza y amistad.

Al Dr. Aarón Domínguez López ya que él como pocos me dio la oportunidad y confianza, brindándome trabajar en el laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), además darme su apoyo y paciencia en este proyecto, por abrirme nuevos horizontes así como nuevas metas, después de tantos consejos y pláticas admirando su experiencia profesional y humana.

Al Médico Cirujano, Raúl Zavala que además de ser mi profesor en la carrera también fue mi asesor de tesis, por la paciencia y esfuerzo, le agradezco su apoyo, tiempo y dedicación para este escrito.

A mis maestros de estadística: Psicóloga Karen, M. en C. Francisco, al Dr. Modesto y al Dr. Isaías por haberme ayudado tanto con los análisis de mis resultados, ya que sin su apoyo no hubiera logrado concretar los resultados, las gráficas y las conclusiones, muchas gracias.

I. Resumen

En la mayoría de los países occidentalizados, las enfermedades crónicas (obesidad, diabetes, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares) están relacionadas con la dieta, ya que representa la principal causa de morbilidad y mortalidad, siendo así consideradas epidémicas actualmente y afectan en gran parte a la población adulta y en menor grado a la población pediátrica.

Las dietas altas en grasa y azúcares refinados que se consumen abundantemente, provocan alteraciones en biomarcadores del metabolismo de lípidos como: RAR α y RXR α que participan en lipólisis y lipogénesis. OBEJETIVO: Evaluación del efecto de las dietas altas en grasa y grasa más fructosa en marcadores lipídicos (RAR α y RXR α) mediante un modelo animal.

MATERIAL Y MÉTODO: Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa *Sprague Dawley* de 6 a 8 meses de edad con un peso de 225 gramos, los cuales fueron separados en tres grupos DC, DG y DGF con una n=8 cada uno, el modelo se reprodujo basado en el abordaje nutricional mediante régimen de dieta sólida alta en grasa (60% lípidos) y fructosa (40% carbohidratos), durante nueve semanas, se extrajo el hígado y se midió la expresión génica de RAR α y RXR α en PCR RT en tejido hepático.

RESULTADOS: El consumo de grasa más fructosa produjo una disminución significativa en los niveles de expresión de RAR α , mientras que la grasa por sí sola provocó una disminución significativa en los niveles de expresión de RXR α . Los análisis de correlación apoyaron lo hallado anteriormente. El consumo de grasa más fructosa pero no de grasa sola, llevó a un aumento significativo de peso del hígado, cantidad de tejido adiposo, así como aumento de glucosa y colesterol.

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	5
III. Marco teórico	7
3.1 Receptores retinoides	7
3.2 RAR	11
3.2.1 RXRα	13
3.3 Expresión de RARα y RXRα	15
3.4 Regulación de la expresión génica	15
3.5 Correguladores; RARα y RXRα	16
3.6 Dieta	18
3.7 Ácidos grasos	18
3.8 Azúcares simples	21
3.8 Dieta como precursor de daño hepático	22
3.9 Tejido Hepático	24

3.10 Metabolismo hepático	26
3.11 Células hepáticas	26
3.12 Estudios realizados en tejido hepático animal	27
IV. Planteamiento del Problema	28
V. Pregunta de investigación	29
VI. Justificación	29
VII. Hipótesis	31
VIII. Objetivo General	31
8.1 Objetivos Particulares	31
IX. Materiales y Método	32
9.1 Tipo de estudio	32
9.2 Criterios de inclusión	32
9.3 Criterios de exclusión	32
9.4 Criterios de eliminación	32
9.5 Adquisición de animales	32
9.6 Acondicionamiento	32
9.7 Consideraciones Éticas	33
9.8 Tipo de dieta	33
9.9 Manejo Dietético	33

9.10 Cuidados diarios	33
9.11 Eutanasia o Sacrificio	33
9.12 Obtención de sangre	34
9.13 Obtención de Hígado	34
9.14 Conservación del tejido	34
9.15 Extracción de RNA total con técnica de Trizol en tejido hepático	35
9.16 Electroforesis en Gel de Agarosa	35
9.17 Lectura en espectrofotómetro (Nanodrop)	35
9.18 Síntesis de cDNA (Transcripción reversa)	35
9.19 PCR tiempo real	37
9.20 Análisis estadísticos	38
X. Resultados	40
XI. Discusión	54
XII. Conclusiones	56
XIII. Sugerencias	57
XIV. Bibliografía	58

II. Introducción

El paradigma de la medicina moderna establece que los estados de salud y enfermedad se encuentran en un equilibrio dinámico constante, donde diversos factores intrínsecos y extrínsecos pueden desplazar este equilibrio hacia uno u otro extremo. Estos factores son: de tipo biológico, con diversos niveles de integración (molecular, celular, tejidos, órganos, sistemas y de todo el organismo); de tipo psicológicos, con sus componentes cognoscitivos, afectivos y cognitivos; y de tipo ambientales, con su particularidad del elemento social, expresado por condiciones de vida y estilo de vida con sus hábitos alimentarios (Pérez et al., 2007).

Los cambios en el fenotipo se dan generalmente o con mayor frecuencia por modificaciones, ya sean sutiles o drásticas en su ambiente (Pérez et al., 2007; Méndez, Chávez y Uribe et al., 2004). Aunque son muchos los factores que integran el medio ambiente, se sabe que la dieta es uno de los más importantes y con mayor poder para alterar el fenotipo de una persona, ya que proporciona una gran cantidad de nutrimentos que tienen repercusiones tanto en la estructura como en el metabolismo celular, ya que la alimentación, como proceso, garantiza la nutrición al convertir los alimentos en nutrimentos. Estos últimos son los que garantizan las transformaciones bioquímicas de asimilación (síntesis), desasimilación (catabolismo), y acoplamiento para producir la energía y nuevas sustancias que necesita el organismo para cumplir funciones biológicas vitales y perpetuarse como especie en el tiempo y el espacio mediante la reproducción celular (Tiniakos et al., 2010; Valenzuela et al., 2012).

Es por ello que los nutrimentos son los abastecedores y sostenedores de la función biológica más importante de los seres vivos: el metabolismo (Gentile et al., 2008). Cuando el metabolismo es normal, la mayor parte de las células pueden realizar las funciones para las que se encuentran especializadas, y entonces se puede decir que el organismo se encuentra en un estado de salud biológica. Cuando el metabolismo está perturbado en diversos grados, el organismo está enfermo o en vías de enfermarse (Izquierdo et al., 2011).

Durante la acumulación de grasas ocurren importantes disfunciones en la actividad enzimática de las vías de lipogénesis, lipólisis en la beta oxidación y en la exportación de lípidos, que hasta el momento no se comprende en su totalidad (Redonnet et al., 2008).

La dieta específicamente alta en grasa además de fructosa que los mexicanos consumimos habitualmente como dieta occidental o también la bien llamada dieta de cafetería, ha contribuido en la presencia de alteraciones metabólicas que además resultan en la ganancia de peso, provocando un conjunto de alteraciones metabólicas, que constituyen factores de riesgo. (Izquierdo et al., 2011).

Es por ello que se han propuesto algunos mecanismos que favorecen la acumulación de lípidos, uno de ellos es la alta o baja expresión de los genes $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$, destacados en la participación de adiposidad en mamíferos, expresión génica mediante la unión a receptores nucleares (proteínas), que influyen en la diferenciación, crecimiento, desarrollo y muerte celular además de su participación en el metabolismo lipídico (Comuzzie et al., 1998).

Este tipo de dieta incrementa la probabilidad de que ocurran complicaciones entre las que destacan: cambios o modificación en la expresión genética de $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$ que podría relacionarse con enfermedades metabólicas, como alteraciones de los lípidos (hipertrigliceridemia, elevación del colesterol), elevación de las cifras de glucosa, presión arterial, obesidad (aumento del perímetro abdominal); además de asociarse con la enfermedad crónico degenerativa llamada esteatosis hepática (Amengual et al.,

2012). El síndrome metabólico y cambios en lípidos junto con enfermedades crónicas metabólicas, se consideran actualmente un problema de salud pública que condicionan alta mortalidad y morbilidad (Ramírez et al., 2003).

Sin embargo, la dificultad de poder predecir en qué momento se presentarán estas complicaciones genéticas, así como el poder evaluar este riesgo cuantitativamente son motivos de una constante investigación, por lo que el presente estudio, busca precisar los efectos de la dieta en la expresión de los genes RAR α y RXR α en el tejido hepático, tras la administración de dietas altas en grasa y fructosa (Astrup et al., 1994).

Por lo anterior, resulta trascendente conocer, cuál es el efecto de la dieta alta en grasa y fructosa en la expresión génica de RAR α y RXR α en ratas macho Sprague Dawley. Es por ello que un cambio en su expresión genética podría revelar algunas de las incógnitas que se tienen acerca de su implicación de enfermedades metabólicas complejas como las ya mencionadas anteriormente (Redonnet et al., 2008; Comuzzie et al., 1998; Amengual et al., 2012).

III. Marco teórico

3.1 Receptores retinoides

Los retinoides son un grupo de pequeñas moléculas lipofílicas, se encuentran presentes en todas las células de los seres vivos, encargados de llevar a cabo diferentes procesos celulares, encontrados en mayor proporción en tejido hepático, ya que regulan la diferenciación de células hepáticas estrelladas (HSC) a través de la activación de los RAR y/o RXR (Bonilla et al., 2000). Son derivados de la vitamina A, el primer indicio de que el ácido retinoico (AR) era el componente activo de la vitamina A provino de la observación de que era capaz de reparar la mayoría de los defectos causados por la deficiencia de vitamina A (DVA).

La vitamina A (retinol) es indispensable tanto en la embriogénesis como en la vida posnatal, para la supervivencia, reproducción, visión, y mantenimiento de tejidos

epiteliales, es por ello que los receptores retinoides están ampliamente implicado en el crecimiento, diferenciación y muerte celular, para completar el desarrollo de un organismo vivo, así como mantener la homeostasis en el mismo (Redonnet A et al., 2008).

Los organismos superiores requieren la habilidad para integrar señales fisiológicas externas y complejas, en una respuesta transcripcional definida a nivel celular. Una de las principales redes génicas está definida por la superfamilia de receptores retinoides (RARs y RXRs) (Méndez et al., 2008).

Los receptores retinoides pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de (una clase de [proteínas](#)) que unen [retinoides](#), como por ejemplo el [ácido retinoico](#) (Blomhoff R et al., 1994). Cuando están unidos a un retinoide, actúan como [factores de transcripción](#), alterando la [expresión génica](#) de aquellos [genes](#) diana que poseen en sus promotores y los correspondientes elementos de respuesta (Orfanos CE et al., 1997). Los receptores están ampliamente representados en el reino animal ya que se han observado en platelmintos, moluscos, insectos y mamíferos.

Existen dos tipos de receptores retinoides: Receptor de ácido retinoide (RAR) y Receptor X retinoide (RXR) (Dony et al., 2013).

En 1995, se propuso la clasificación de los RARs y RXRs, destacando que estos se encuentran en la clase 2 (Figura 1) (Mangelsdorf et al., 1995). Donde RXR (también conocidos como la subclase tiroidea/retinoide/vitamina D3). Esta clase incluye al receptor de la vitamina D3 (VDR), al receptor de hormona tiroidea (TR), el receptor del ácido retinoico (RAR), el receptor activador por proliferadores de peroxisomas (PPAR), receptor X hepático (LXR), receptor famesoide (FXR) (Orfanos CE et al., 1997). Los receptores de la clase 2 se encuentran normalmente dentro del núcleo, uniéndose a elementos de respuesta, en ausencia de ligado (Mangelsdorf et al., 1995). Algunos miembros de esta clase son capaces de ejercer un efecto represivo sobre la transcripción génica (Ayala et al., 2008).

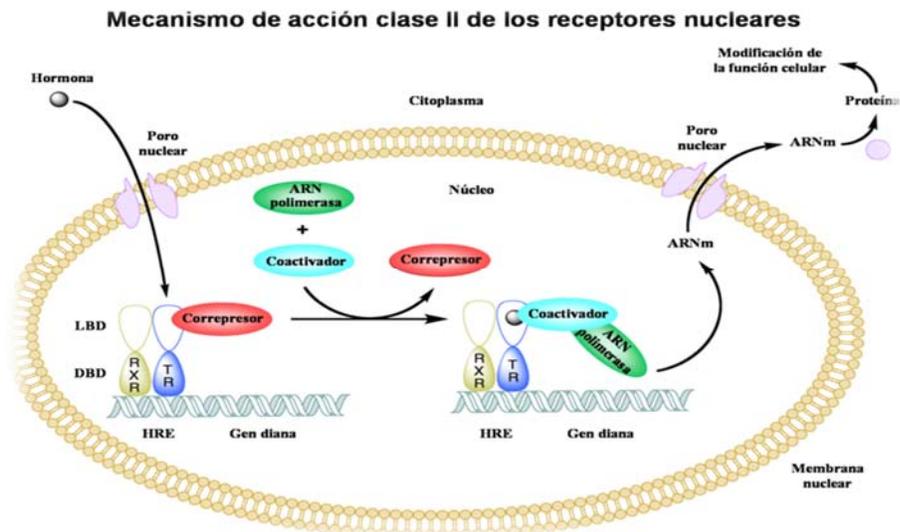


Figura 1. Mecanismo de acción que presentan la clase 2 de receptores nucleares, donde se encuentran RAR y RXR. Tomado de Mangelsdorf, 1995.

Características

En general, los receptores retinoides tienen estructuras moleculares altamente conservadas, es decir, son muy similares en organismos muy diferentes y se encuentran principalmente almacenados en el hígado en forma de gotas de grasa.

Estructura

Los receptores retinoides son factores transcripcionales y el diseño básico de la proteína está bien conservado entre los miembros de la superfamilia. Se dividen en cinco dominios (figura 2).

- i. Dominio A/B. Conocido como dominio modular, se localiza en el sitio amino terminal de la proteína y es el dominio menos conservado. RAR y RXR codifican variantes con propiedades biológicas por corte y empalme que se diferencian únicamente en la composición del dominio A/B. Este dominio también contiene ligando trasactivador independiente (Activador funcional de la transcripción o AF-1) y contiene aminoácidos que son objeto de modificaciones post-traduccionales (por ejemplo la fosforilación). Evidencias recientes sugieren que los correguladores de células específicas también se unen en el dominio A/B.
- ii. Dominio C. Dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés) es la región del receptor y es altamente conservado en la región de los receptores retinoides. El DBD de estos receptores contienen dos dedos de zinc, los cuales consisten en 66-70 aminoácidos y una extensión de aminoácidos carboxilo terminal de aproximadamente 25 aminoácidos que median la interacción entre DNA-proteína y proteína-proteína.
- iii. Dominio D. Conocido como la región de bisagra, que tiene como propósito servir de unión flexible entre DBD y el (dominio de unión al ligando o LBD, por sus siglas en inglés) del receptor. La presencia de esta bisagra se cree que ha permitido la unión de estos receptores a (repetido invertido o IR) y (repetidos directos o DRs), mientras mantengan una orientación idéntica de LBD. La caja CoR la cual es un subdominio importante para la interacción con corepresores y se localiza en este dominio.
- iv. Dominio E. Conocido como LBD y media un choque térmico en la proteína de unión, dimerización, unión al ligando y a cofactores. En el extremo carboxilo del dominio se activa una función del motivo 2 (Activador funcional de la transcripción o AF-2), la cual es esencial para la transactivación del ligando.
- v. Dominio F. La unión de este dominio ha sido pobremente estudiada y no se presenta en todos los receptores.

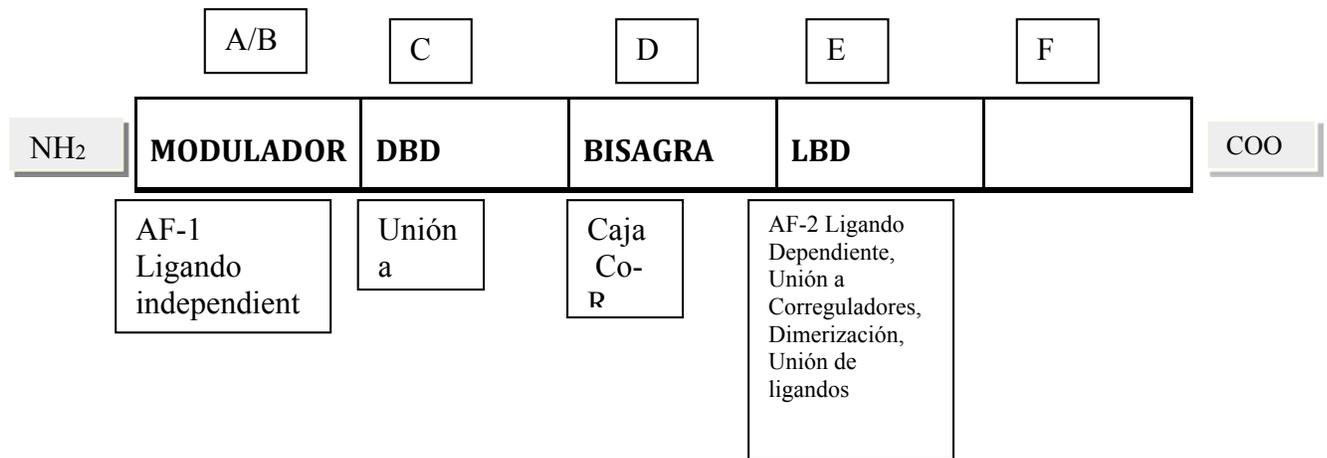


Figura 2. Anatomía de los receptores retinoides. Tomada de Ayala, 2008.

Poseen varios sitios de interacción: receptor-DNA, receptor-ligando, y receptor-receptor.

1.- Receptor- DNA: Ocurre a través de un sitio de posición central en la estructura del receptor identificado como: (DBD) este interacciona con un sitio específico del DNA llamado (elemento de respuesta o RE por sus siglas en inglés), la interacción entre estos se da a partir de los llamados (motivos estructurales AF-1 o AF-2), los cuales tienen función específica generalmente de aminoácidos, un sitio de un dominio con múltiples funciones (Figura 2).

2.- Receptor -Ligando: Hacia ambos lados de la estructura del receptor se encuentran otros sitios.

Extremo Amino terminal (NH₂); Se identifica un sitio denominado Activador funcional de la transcripción (AF-1), este interacciona con ligandos, es importante para la activación de la expresión génica.

Extremo Carboxilo Terminal (COOH); Existen dos sitios próximos al DBD, él más importante es (LBD), con el cual interactúan ácidos grasos o sus derivados (Figura 2).

3.- Receptor- Receptor; (proteína de unión al ligando o LBP), de igual estructura o distinta.

Si la interacción receptores-receptores de igual estructura formarán homodímeros, pero si es de diferente estructura se llamara heterodímeros. RARs y RXRs se unen como heterodímeros u homodímeros para elementos específicos del DNA, llamados elementos de respuesta a hormonas, que se encuentran en la región 5' regulatoria de los genes blancos (Ranaud y Moras et al., 2000).

Extremo Carboxilo Terminal del receptor; se encuentra un segundo activador funcional de la transcripción (AF-2), su actividad es dependiente de la unión de ligandos al receptor (Figura 2).

El ligando natural de estos receptores es el ácido 9-cis retinoico, el cual estimula la formación de heterodímeros del tipo RXR/RAR, RXR/PPAR y RXR/LXR. Además del ácido retinoico, los RXR pueden también aceptar como ligandos a ácidos grasos.

3.2 RAR

El receptor de ácido retinoico (RAR) es un tipo de [receptor nuclear](#) (Germain P et al., 2006) que es activado tanto por las formas *trans* como por la forma 9-cis del [ácido retinoico](#) (Allenby G et al., 1993). Se han descrito tres subtipos de receptores de ácido retinoico hasta el momento (RARs) (Dony et al., 2013).

- [Receptor de ácido retinoico alfa](#) (RAR α)
- [Receptor de ácido retinoico beta](#) (RAR β)
- [Receptor de ácido retinoico gamma](#) (RAR γ)

El receptor de ácido retinoico alfa ($RAR\alpha$), también conocido como NR1B1 (de sus siglas en inglés "nuclear receptor subfamily 1, group B, member 1") (Figura 3).



Figura 3. Estructura tridimensional de receptor de ácido retinoico ($RAR\alpha$). Tomado de (Ranaud y Moras 2000).

El receptor de ácido retinoide alfa ($RAR\alpha$) tiene como agonista a ATRA y a 9-Cis-RA y el receptor de retinoides (RXR), que tiene como agonista a 9-Cis-RA. ATRA y 9-Cis-RA son moléculas muy parecidas en su forma tridimensional y se diferencian por la posición de los dobles enlaces, uno de ellos es un alcohol y el otro una cetona (Burns et al., 2007). $RAR\alpha$ ha sido el más investigado hasta el momento, ya que se ha visto mayor expresión en tejido hepático, jugando un papel importante en la oxidación de ácidos grasos mediante la unión a otros ligandos o receptores como $RXR\alpha$.

Al igual que ocurre con otros receptores nucleares, los receptores de ácido retinoico RARs forman heterodímeros con el [receptor X retinoide](#) en ausencia de [ligando](#) (Figura 4) (Levin A et al., 1992). El [dímero](#) RAR/RXR se une al [elemento de respuesta a hormonas](#) en el [ADN](#), formando un complejo con una proteína [correpresora](#) (Buck J et

al., 1991). La unión de un ligando agonista a RAR da lugar a la disociación del correpresor y al reclutamiento de una proteína coactivadora que activan el promotor y así la transcripción de los genes diana (Ohata et al., 2000). El papel que juega este receptor en el metabolismo de lípidos es muy relevante ya que está implicado en los procesos de oxidación de ácidos grasos.

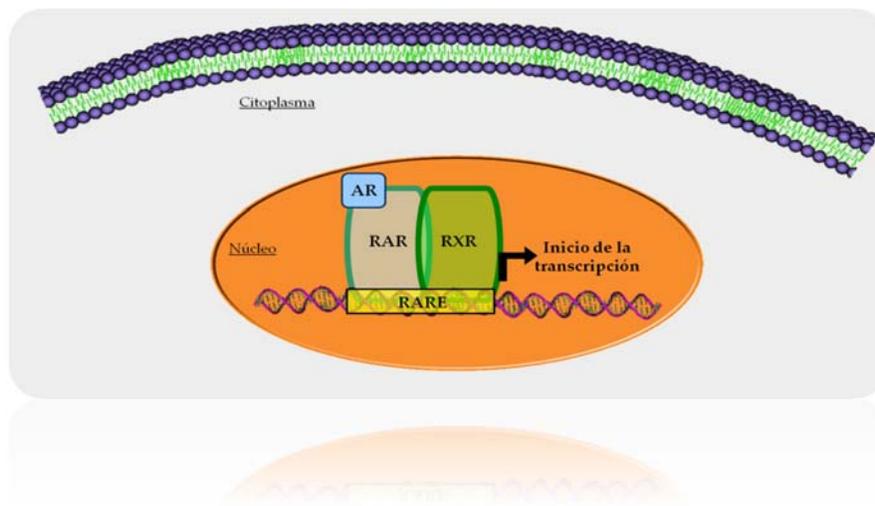


Figura 4. RAR y RXR formando heterodímeros, para poder dar inicio a la transcripción. (Tomado de Mitsuru Ohata, Masayoshi Yamauchi et al., 2000).

3.2.1 RXR

El receptor X retinoide (RXR) es también un [receptor nuclear](#) que es activado por el [ácido retinoico](#) (Germain P et al., 2006). Se han descrito tres subtipos de receptores X diferentes de este tipo (RXRs)

- [Receptor X retinoide alfa](#) (RXR α)
- [Receptor X retinoide beta](#) (RXR β)
- [Receptor X retinoide gamma](#) (RXR γ)

Los receptores RXR forman heterodímeros con la subfamilia de receptores nucleares de hormona tiroidea, incluyendo los RAR, FXR, LXR, PPAR, PXR y receptor de vitamina D (Levin AA et al., 1992).

RXR α sirven como adyuvante para formar heterodímeros obligados para otros receptores nucleares, la actividad transcripcional de algunos de estos heterodímeros son los llamados permisivos, que responde a ligandos de cualquiera de las partes, incluso de una manera sinérgica cuando ambos ligandos se unen, proporcionando un mecanismo de amplios efectos de los retinoides sobre la expresión génica (Amengual et al., 2012). Es muy importante destacar que este receptor retinoide al dimerizar con genes o receptores ya mencionados, tiene la tarea de actuar en el metabolismo de lípidos directamente en la oxidación y síntesis de ácidos grasos para mantener el equilibrio en las células.

El receptor X retinoide alfa (RXRA), también conocido como NR2B1 (de sus siglas en inglés "nuclear receptor subfamily 2, group B, member 1") (Figura 5).

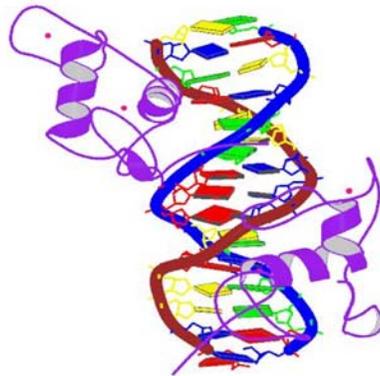


Figura 5. Estructura tridimensional de receptor de X retinoide (RXR α). Tomado de (Ranaud y Moras 2000).

3.3 Expresión de RAR α y RXR α

A pesar de que las modificaciones tanto cuantitativas como cualitativas de los hábitos dietéticos asociados a una vida sedentaria son considerados determinantes mayores del incremento progresivo de la en la infancia y la adolescencia, durante los últimos 35 años, existen un interés creciente por la tipificación de los genes y marcadores cromosómicos que de algún modo están correlacionados con la regulación del metabolismo energético y determinan la predisposición del individuo al desarrollar obesidad (Méndez et al., 2004).

Se ha explorado el papel de genes específicos en la obesidad humana y el contenido de grasa a partir de estudios con alteraciones en contraste con estudios en roedores y otros modelos animales (Wensaas et al., 2009). El avance ha sido notable en este campo, actualmente se han descrito varios genes cuyas mutaciones son causa de obesidad o del aumento a desarrollar la susceptibilidad, entre ellos los receptores retinoides (Alemán G, et al., 2004).

RAR α y RXR α controlan la expresión de genes que participan en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y están involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos en diferentes tejidos (Alemán G, et al., 2004). RAR α y RXR α se localizan en diversos tejidos, encontrándose una mayor expresión en el hígado y tejido adiposo, sirviendo como sensores de los lípidos dietarios que regulan el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos, encargándose al igual del control de una variedad de genes de varias rutas del metabolismo de lípidos, que incluyen el transporte, captura, unión intracelular y activación de ácidos grasos, así como su catabolismo y almacenamiento (Alemán G, et al., 2004).

3.4 Regulación de la expresión génica.

RAR α y RXR α son reguladores importantes de muchos genes críticos para el control de la homeostasis en el metabolismo de lípidos. Se ha reportado que los RARs y RXRs son ligandos para los PPARs, con lo cual se inducen respuestas fisiológicas como la β -oxidación y adipogénesis (Wensaas et al., 2009). También uno de los principales ligando de estos receptores retinoicos es LXR que se da en respuesta para mantener el control del metabolismo de lípidos por medio de la unión a SREBP1c para controlar la lipogénesis (síntesis de ácidos grasos) (Amengual et al., 2012).

Estos procesos mencionados se llevan a cabo en las mitocondrias del tejido hepático, aunque la acción de los RAR α y RXR α no solamente están implicado sobre el metabolismo de lípidos, además se han visto asociados sobre la modulación de NF- κ B como posible denominador común en los efectos antiinflamatorios (Wensaas et al., 2009).

Es por ello la importancia de este estudio, ya que radica en destacar el metabolismo de lípidos en el organismo que se lleva a cabo en tejido hepático, donde sus receptores están involucrados para llevar a cabo la oxidación de ácidos grasos en conjunto con una serie de genes como: LXR, SREBP1c, PPAR α , entre otros que participan en las cascadas de señalización, para que exista un equilibrio entre la síntesis (lipogenesis) y la oxidación (lipólisis) para que el hígado esté sano (Figura 6) (Bonilla et al., 2000; Amengual et al., 2012).

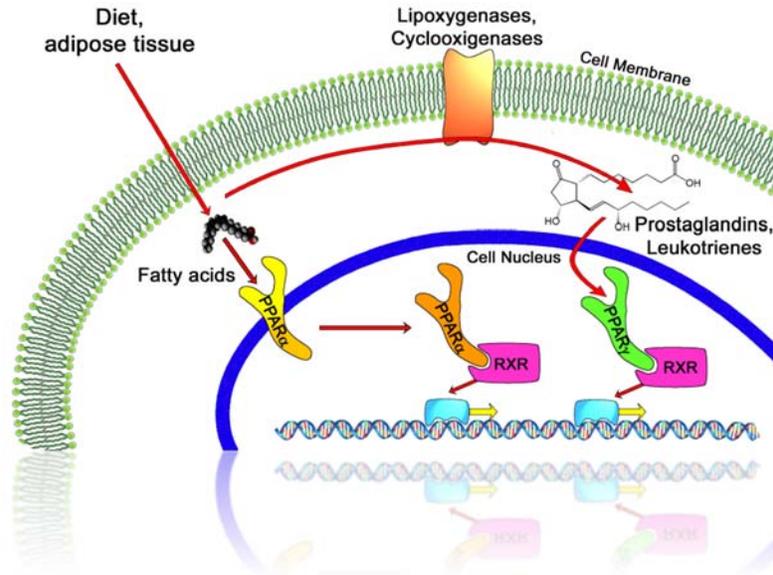


Figura 6. Importancia de los receptores nucleares en el hígado (oxidación de ácidos grasos). (Tomado de Mitsuru Ohata, Masayoshi Yamauchi et al., 2000).

3.5 Correguladores; RAR α y RXR α

Para que los RAR α y RXR α actúen sobre genes específicos, se requiere la presencia de varios cofactores que puedan ser activadores o correpresores, los coactivadores sirven como enlace entre los factores de transcripción tejido específico, tales como los RAR α , RXR α y la maquinaria de inicio de la transcripción, se activan en presencia de ligandos como ácidos grasos poliinsaturados, fibratos, entre otras, para posteriormente formar heterodímeros como RXR , por otra parte los receptores retinoides requieren ser fosforilados a través de diversas rutas de señalización para encontrarse con su estado activo (Ayala et al., 2008). Los heterodímeros formados se unen a los elementos de respuesta a otros genes como LXR, SRBP1c ó los PPARs dependiendo el tipo de ruta o mecanismo (Johnson et al., 2009).

Por lo tanto RAR α y RXR α se consideran blancos moleculares prometedores para intervenciones terapéuticas (terapia génica personalizada), contra la obesidad y

comorbilidades como; dislipidemías, resistencia a la insulina e hígado graso no alcohólico.

RAR α y RXR α se expresan también en hepatocitos, en menor grado en ojos y músculo. La expresión de RAR α y RXR α en estos órganos y tejidos están relacionados con la β -oxidación en mitocondrias y peroxisomas (Wensaas et al., 2009).

Los ratones transgénicos deficientes en RAR α y RXR α desarrollan obesidad e hipertrigliceridemia en ausencia de hiperfagia que se caracteriza por una acumulación masiva de lípidos en el corazón e hígado (Sharman M.R et al., 2006). RXR α , participan en el mantenimiento de las concentraciones de glucosa, lo que es relevante para evitar el desarrollo de hipoglicemia en estado de estrés metabólico agudo, como el ayuno y el ejercicio, se han descrito estudios en donde RAR α y RXR α se expresan en animales con daño hepático producto de una dieta alta en grasa y alcohol (Alemán G, et al., 2004).

Estos receptores, se encuentran abundantemente en tejido adiposo donde se promueve la diferenciación de adipocitos, almacenamiento de lípidos y metabolismo de glucosa, en roedores es débil la asociación entre la expresión de RXR α y el grado de obesidad, por lo que el aumento de peso u obesidad podría elevar o disminuir la expresión del RNA mensajero de estos receptores retinoides (Caldwell S et al., 2006)

Por lo tanto, RAR α y RXR α que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que presentan sitios de acción, se expresan en diferentes órganos y tejidos, teniendo funciones biológicas importantes para la homeostasis del organismo (Palinski W et al., 2006).

3.6 Dieta

Es llamada dieta al conjunto de alimentos y platillos que se consume cada día. Las modificaciones que se realicen a la dieta pueden ser medida preventivas para los

individuos que tengan una predisposición genética o que cursan con ciertos estados patológicos, o bien que puede corregir un problema agudo o crónico que requiere un plan alimentario con características específicas.

El primer condicionamiento para que la dieta sea correcta y nutricionalmente equilibrada es que estén presentes en ella la energía y todos los nutrimentos necesarios en las cantidades adecuadas y suficientes para cubrir las necesidades de cada persona y evitar deficiencias (Pérez et al., 2005).

El balance entre las necesidades de energía y la ingesta calórica es principal determinante del peso corporal. Cuando hay un balance positivo y la dieta aporta más energía de la necesaria, el exceso se almacena en forma de grasa dando lugar a sobrepeso y obesidad (Bourgues et al., 2005; Mijas de la Torre et al., 2002). Por el contrario, cuando la ingesta de energía es inferior al gasto, se hace uso de las reservas corporales de grasa y proteína, produciéndose una disminución de peso y a la larga una mala nutrición (Pintor et al., 2003).

Por ello que la dieta debe guardar armonía y debe tener los requerimientos de macronutrientes y micronutrientes para cada individuo, existen diversos factores que lo determinan como: composición corporal, edad, sexo, genotipo, país de residencia, disponibilidad de alimento, etc. (Dirección General de Promoción de Salud et al., 2013).

3.7 Ácidos grasos.

Dentro de los macronutrientes son importantes en patologías hepáticas, consisten en una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos. Son un grupo heterogéneo de compuestos que incluyen grasas y aceites ordinarios. Desde el punto de vista químico, los ácidos grasos son cadenas rectas de hidrocarburos que terminan en un grupo carboxilo en un extremo y en un metilo en otro extremo (Aldasoro et al., 2011).

Los ácidos grasos son ramificados en cadenas hidrocarbonadas, conectados por enlaces singulares (ácidos grasos saturados) o por enlaces dobles (ácidos grasos insaturados). Los ácidos grasos se clasifican por el número de carbonos, la posición del primer enlace

y por el número de dobles enlaces (figura 7). Las grasas, bajo la forma de triglicéridos del tejido adiposo que es como se almacenan en el organismo, constituyen la principal forma de almacenamiento de energía (Benyon et al., 2005). Las grasas son necesarias para mantener las membranas celulares funcionales apropiadamente, para aislar los órganos del cuerpo contra el shock, para mantener la temperatura del cuerpo estable y para mantener la salud de la piel y el cabello (Hick et al., 2001).

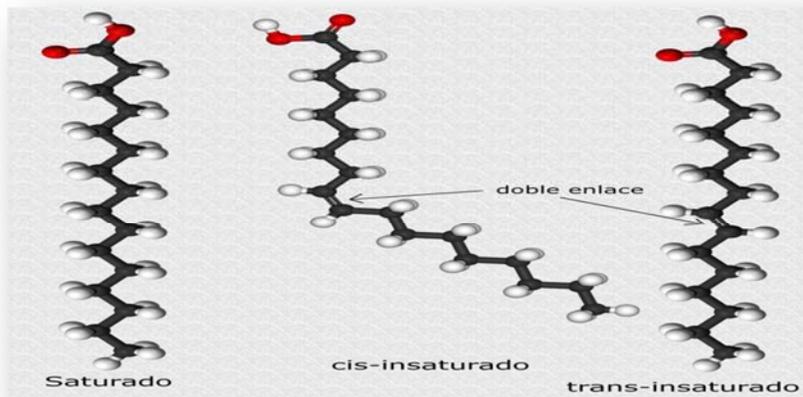
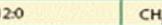
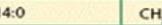
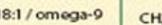
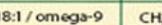
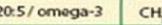
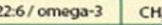


Figura 7. Estructura de ácidos grasos saturados y no saturados (Tomado de Hicks Gómez et al., 2007).

El cuerpo no sintetiza ciertos ácidos grasos (llamados ácidos grasos esenciales) y la alimentación debe ser suplementada con estos ácidos grasos (Tabla 1) (Aldasoro et al., 2011).

Ácido Láurico	12:0	CH ₃  COOH
Ácido Mirístico	14:0	CH ₃  COOH
Ácido Palmítico	16:0	CH ₃  COOH
Ácido Estearico	18:0	CH ₃  COOH
Ácido Eláidico trans	18:1 / omega-9	CH ₃  COOH
Ácido Oleico cis	18:1 / omega-9	CH ₃  COOH
Ácido Linoleico cis	18:2 / omega-6	CH ₃  COOH
Ácido Alfa-linolénico cis	18:3 / omega-3	CH ₃  COOH
Ácido Araquidónico cis	20:4 / omega-6	CH ₃  COOH
Ácido Eicosapentanoico (EPA) cis	20:5 / omega-3	CH ₃  COOH
Ácido Docosahexanoico (DHA) cis	22:6 / omega-3	CH ₃  COOH

■ AG esencial ■ AG semiesencial

Tabla 1. Estructura de ácidos grasos esenciales para la nutrición humana. (Tomada de Aldasoro et al., 2011).

Los lípidos o grasas tiene un alto contenido de energía de 9 kcal/g (aprox. 37.7 kJ/g). Evidentemente las fuentes principales las constituyen alimentos de origen animal, grasas y aceites vegetales.

El tipo de grasa influye en la diferenciación de adipocitos, síntesis de colesterol y metabolismo. Muchos ácidos grasos activan a los receptores retinoides (RARs y RXRs), fungiendo como ligandos. RARs y RXRs al activarse provocan una disminución del tejido adiposo así evitando el proceso de acúmulo excesivo de grasa en diferentes tejidos (obesidad). Es por ellos que el tipo de grasa que se consume es importante para cambio de peso corporal (Fieser et al., 2004).

Por otra parte los ácidos grasos poliinsaturados son los mejores activadores de RARs y RXRs, con menor impacto la grasa saturada y monoinsaturada (Fieser et al., 2004).

La mayoría de los ligandos que se unen específicamente a RARs y RXRs, lo hacen con afinidad baja en comparación con los ligandos del resto de los receptores nucleares (RN). Se ha observado que los receptores retinoides son mejores estimuladores de oxidación de ácidos grasos, así como potentes supresores de la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol. Se conoce que la ingestión de dietas altas en grasas saturadas consumidas durante varias semanas incrementa la concentración de triacilglicerol séricos y promueve la resistencia a la insulina. Se ha mostrado que su ingesta, rápidamente suprime la lipogénesis hepática en roedores (Alemán G et al., 2004).

Debido a que las grasas son ligandos naturales de los receptores retinoides, es importante conocer, que es lo que pasa cuando con un individuo se alimenta excesivamente con ácidos grasos, ya que una ingesta normal de estos promoverá que los genes participen normalmente en procesos del metabolismo (Hick et al., 2001).

3.8 Azúcares simples

Son compuestos orgánicos formados en su mayoría por carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque en algunos, se encuentran también el azufre y nitrógeno (Harper et al., 2001). Se denomina técnicamente azúcares a los [glúcidos](#) que generalmente tienen [sabor dulce](#), como son los diferentes [monosacáridos](#), [disacáridos](#) y [oligosacáridos](#), aunque a veces se usa incorrectamente para referirse a todos los carbohidratos (Tabla 2) (Fieser et al., 2004; Benyon et al., 2003)

Grupo	Subgrupo	Digestión en intestino
Monosacáridos ó Azúcares simples	-Monosacáridos: Glucosa, fructosa, galactosa, -Disacáridos: Sacarosa, lactosa, maltosa	Bien absorbido Bien digerido en intestino delgado, excepto lactosa
Oligosacáridos	α -glucanos(maltodextrinas):	Bien digeridos y absorbidos

	productos de hidrólisis parcial del almidón NO α -glucanos: Fructooligosacáridos, diversas insulinas	No dirigidos en intestino delgado, alcanzando el colon
Polisacáridos	α -glucanos(almidones): Amilosa, Amilopectina NO α -glucanos (polisacáridos no almidonaceos): Pared celular, celulosa, hemicelulosa, pectina	Algunas formas resistentes alcanzan el colon No digeridos en intestino delgado, alcanzan el colon

Tabla 2. Clasificación de los Monosacáridos, Oligosacáridos y Polisacáridos (Tomado parcialmente de Fieser et al., 2004).

Forman parte fundamental de la alimentación humana. Tiene una misión principalmente energética, pero algunos de sus derivados en el organismos son de naturaleza estructural o funcional, generalmente unidos a una fracción proteica (proteoglicanos y glucoproteínas) o lipídica (glucolípidos) (Benyon et al., 2003). Sus principales fuentes naturales se encuentran las frutas y la miel que incluso pueden contener hasta 50 % de azúcar y entre los alimentos industrializados se encuentran las bebidas carbonatadas, entre otra (Orristal et al., 2001).

Los azúcares refinados suministran calorías, pero carecen de vitaminas, minerales y fibra. Estos azúcares simples a menudo son llamados "calorías vacías" y pueden llevar al aumento de peso ya que estas se acumulan en el cuerpo en forma de grasa (Enig et al., 2000).

3.9 Dieta como precursor de daño hepático.

La variabilidad biológica y genética de los requerimientos nutrimentales se toman en cuenta factores dietéticos, fisiológicos, ambientales y sociales, y se han considerado desde el punto de vista práctico la importancia de la nutrición sobre la expresión de genes así como el efecto de diversas circunstancias ambientales y fisiológicas.

En consecuencia, los nutrimentos modulan la regulación de la expresión génica. Lo cual afecta significativamente al desarrollo y la respuesta al tratamiento de numerosas enfermedades cardiovasculares, endócrinas o hepáticas.

El descubrimiento de la importancia de los lípidos en una nutrición sana es un proceso que se inició a partir de los años veinte. Anteriormente se creía que las grasas no desempeñaban un papel esencial en la alimentación si se consumían cantidades suficientes de vitaminas y minerales con la dieta. Sin embargo, Aron propuso en 1918 que la grasa tenía un valor nutritivo que no podía ser suplido por otros componentes de los alimentos. Posteriormente, Burr, documentaron la existencia de una sustancia esencial en la grasa: el ácido linoleico, señalando que en ausencia de este nutriente se desarrollaban síntomas que afectan la salud de la piel, retención de agua, fertilidad y crecimiento (H. Aron et al., 1918; Burr et al., 2012).

Posteriormente se presentó atención a la relación existente entre la cantidad y el tipo de grasa consumida y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades degenerativas. El mensaje principal que resultó de estos estudios llevó a aconsejar moderación en el consumo de grasa total, grasa saturada y colesterol. En los últimos diez años muchas fracciones lipídica han recibido atención al comprobarse su importancia en la prevención de diversas patologías y deterioros. Las investigaciones realizadas y el desarrollo de alimentos enriquecidos con estas fracciones lipídica (ácidos grasos, omega 3, esteroides vegetales, etc.) abren nuevos caminos en la búsqueda de una mejoría en la salud y calidad de vida, por modificaciones en el consumo de grasa (H. Aron et al., 1918).

Se debe de tomar en cuenta que una vida con tipo de alimentación alta en grasa o en calorías no solo repercute en un aumento de peso, puesto que se presentan diversas

patologías asociados a la obesidad como diabetes, hiperlipidemia, cáncer, resistencia a la insulina, esteatosis hepática no alcohólica además de problemas genéticos como inhibición o sobre expresión de genes asociados al aumento del apetito o pérdida de saciedad. Se sabe que la obesidad ha sido reconocida como una enfermedad metabólica que va más allá del desbalance entre el gasto y la ingesta de energía, y los estudios recientes han ampliado el conocimiento de la compleja interacción entre el papel regulador del adipocito, la composición de la dieta y el gasto energético.

La prevalencia de la obesidad se ha incrementado de forma paralela al consumo excesivo de grasas en la dieta además de la ingesta de fructosa. Pero, existe poca información sobre el efecto de la fructosa sobre la secreción de reguladores endocrinos del balance energético como la insulina, la ghrelina y la leptina (proteínas asociados con la saciedad alimenticia). Es por ello que se propone que al producir un menor efecto insulinémico, la ingesta excesiva de fructosa podría a la vez estar aumentando el apetito y, por lo tanto, la ingesta de alimentos (Ackroff et al., 2011).

Además siendo la dieta un factor importante en la incidencia de diabetes tipo 2, ya que ha aumentado a nivel mundial en las últimas décadas. La dieta es uno de los factores ambientales más influyentes en el desarrollo de esta enfermedad. Entre los componentes de la alimentación, el incremento en el consumo de fructosa se ha correlacionado con la ganancia de peso, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus.

En estudios recientes se ha podido demostrar que en pequeñas o moderadas cantidades de fructosa parecen no tener impacto en el control glicémico del paciente con diabetes mellitus tipo 2. Pero, como se ha mencionado, el consumo excesivo podría empeorar problemas de hipertrigliceridemia o sobrepeso.

Es por ello que la dieta hiperlipídica e hipercalórica es sinónimo de pérdida de agua del organismo más aumentos graduales en tejido adiposo y acumulación de grasa en tejido hepático. Por lo tanto sus características las hacen insuficientes (no están todos los principios inmediatos y nutrientes), monótonas (al eliminar los carbohidratos, el número de alimentos que se puede consumir se reduce notablemente), desequilibradas

(las proporciones de proteínas, carbohidratos y lípidos no corresponden a las que la ciencia considera adecuadas para el organismo humano y además estas dietas suelen considerarse universales, sirve para todos los individuos sin tener en cuenta su condición fisiológica), incompletas (no incluyen todos los principios inmediatos) y dañinas para el organismo (no respetan el equilibrio homeostático del organismo) (Burr et al., 2012).

3.10 Tejido Hepático

El hígado es el segundo órgano más grande del cuerpo humano después de la piel, y es el mayor órgano interno. El hígado se ve por primera vez en el embrión en desarrollo, durante la cuarta semana de embarazo (Segarra et al., 2006). A medida que el feto se desarrolla, el hígado se divide en dos secciones, llamadas lóbulos: el derecho y el izquierdo. Con el tiempo, el lóbulo derecho será seis veces más grande que el izquierdo. Para cuando nace el bebé, el hígado constituye cerca de un 5% de su peso total (Highleyman et al., 2008). De color marrón rojizo, pesa aproximadamente (1,300 Kg) en los varones adultos y tiene el tamaño de una pelota de fútbol americano (Highleyman et al., 2008). Este órgano tiene la particular capacidad de regenerar su propio tejido: puede perder hasta las tres cuartas partes del mismo y volver a su estado original en unas pocas semanas. Esto permite que las personas que necesitan trasplantes puedan recibir una parte del hígado de un donante vivo (Segarra et al., 2006).

Localizado bajo el diafragma y las costillas, se sitúa en gran parte al lado derecho y se extiende a través del lado izquierdo del cuerpo por encima del borde superior del estómago. (Figura 7). La verdosa vesícula biliar y sus vías están exactamente debajo del lado derecho del hígado (Highleyman et al., 2008). El suministro de sangre del hígado proviene tanto del corazón como del tracto digestivo en forma directa a través de un gran vaso sanguíneo llamado la vena porta. Cada uno de los dos lóbulos principales contiene unidades más pequeñas llamadas lobulillos (Oclu-salud et al., 2007). La mayoría de los hígados tienen de 50.000 a 100.000 lobulillos que constan de una vena rodeada por minúsculas células hepáticas llamadas hepatocitos (Gómez et al., 2007).

Estas células purifican la sangre, eliminan los desechos, toxinas y almacenan nutrientes saludables para que el cuerpo los utilice cuando sea necesario (Oclu-salud et al., 2007).

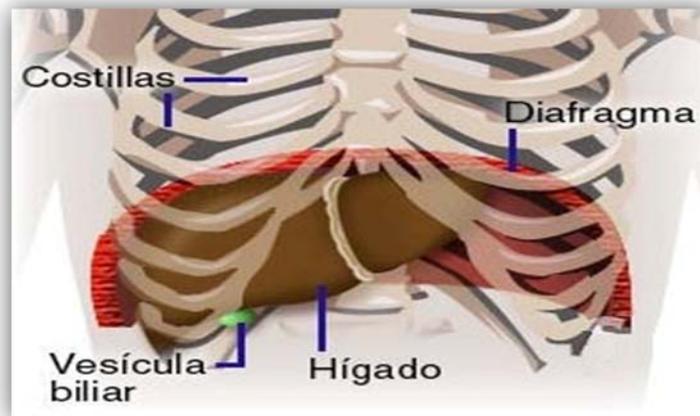


Figura 7. Localización del hígado en seres humanos. (Tomado de Fristsch et al., 2008).

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas. Juega un papel en la digestión, en el metabolismo del azúcar y las grasas, e incluso en el sistema inmunitario. Procesa prácticamente todo lo que comemos, respiramos o absorbemos a través de la piel. Alrededor del 90% de los nutrientes del organismo procedentes de los intestinos pasan por el hígado, convierte los alimentos en energía, almacena nutrientes y produce proteínas sanguíneas. Además, actúa como filtro para eliminar patógenos y toxinas de la sangre.

3.11 Metabolismo hepático

Como resultado de la absorción intestinal, llega al hígado por la vía porta fundamentalmente glucosa, así como fructosa y galactosa. La glucosa es fosforilada por la glucoquinasa, una enzima de alta K_m e inducible por sustrato y por insulina. De esta forma, la glucosa solo se metaboliza en el hígado si llega en cierta cantidad, de lo contrario, atraviesan las sinusoides hepáticos sin metabolizarse y se vierte

directamente a la circulación sistémica para la utilización por los demás tejidos. En cambio la galactosa y fructosa se fosforilan en el hígado por la quinasas específicas de baja Km, lo que asegura su metabolización en este órgano, pasando solo a la circulación sistémica en condiciones límites de exceso (Lee et al., 2000; Nelson et al., 2008).

Glucogénesis: El glucógeno así formado constituye la reserva de glucosa, que podría liberarse a la sangre en los periodos interdirigidos.

Glucolisis: La vía glucolítica en el hígado funciona principalmente para la síntesis de triglicéridos (lipogénesis), que serán enviados a los tejidos periféricos en forma de proteínas de baja densidad (VLDL) (Estudio FAO et al., 2012).

3.12 Células hepáticas.

Los ácidos grasos se almacenan en forma de triglicéridos (TG) donde se sintetizan continuamente. El hígado es un sitio muy importante de síntesis de ácidos grasos a partir de otras moléculas. A partir de sustratos sobrantes sintetiza ácidos grasos que por esterificación dan TG, que son enviados al tejido adiposo unidos a proteínas en lipoproteínas distintas a los quilomicrones. Éstas son sintetizadas por el hígado, tienen distinta proporción de componentes. Tienen muy poca densidad, las VLDL (proteínas de baja densidad). Su función es transportar los ácidos grasos sintetizados por exceso de hidratos de carbono.

Para recogerlos el adipocito, necesita un enzima igual al anterior que los hidrolice. La lipoproteína suelta parte de los TG y pasa a LDL, más densa y especialmente rica en colesterol, que manda a tejidos periféricos. La HDL es más densa, el colesterol en esta forma no es malo porque se transporta de vuelta al hígado para ser metabolizado. El tejido adiposo no puede degradar el glicerol porque no puede fosforilarlo.

El cerebro necesita un continuo aporte de glucosa para su normal funcionamiento, aunque en ocasiones, puede adaptarse a niveles más bajos de los habituales.

Las concentraciones de la glucosa en sangre, en adultos, se encuentran habitualmente entre 72.0 - 99.0 mg/100 mL (4.0-5.5 mmol/L). Pero, cuando se ingiere una comida que

contiene carbohidratos, las glucemias pueden elevarse hasta 135.0 mg /100 mL, durante un cierto período de tiempo. En una fase de ayuno, pueden ser tan bajas como de 54.0 – 63.0 mg/100 mL. Si los niveles de glucemia se encuentran alrededor de 180.0 mg /100 mL, como ocurre en la diabetes mellitus, o con niveles más altos, como en algunos individuos en graves situaciones patológicas, llega a eliminarse glucosa por la orina (glucosuria).

3.13 Estudios realizados en tejido hepático animal.

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiológicos asociados a enfermedades complejas, sus características histológicas y ensayos de nuevas terapias. Una gran parte de los trabajos se desarrollan en roedores, ratones y ratas principalmente como Sprague Dawley, dada su similitud biológica con el hombre y el gran conocimiento que se tiene a todos los niveles (genético, molecular, enzimático) de estas especies (Johnson et al., 2009).

Se distinguen dos grandes métodos en modelos animales: los inducidos por agentes externos (sea la dieta, fármacos o toxinas) o los que son resultado de modificaciones genéticas (espontáneas o artificiales). A veces se combinan varios tipos (Johnson et al., 2009).

Cuando los animales como las ratas se someten al estrés, como por ejemplo el ayuno de 24 horas o ingesta de una dieta rica en grasas durante varias semanas, hay un incremento en la liberación de ácidos grasos hacia el hígado, estos desarrollan complicaciones masivas como es la acumulación de células adiposas y esto ocurre a pesar de la disminución de la entrada hepática de ácidos grasos y secreción de VLDL normal y es más frecuente tener como resultado la disminución de la oxidación de ácidos grasos en el tejido hepático (Curi et al., 1990).

En definitiva, los diferentes modelos experimentales en animales para manifestar daños en el hígado reproducen de una forma u otra los mecanismos patógenos de la enfermedad en humanos (Ayala et al., 2008).

Para ellos, un primer paso es el desarrollo de complicaciones metabólicas en este caso, el acúmulo de depósitos de grasa en el hígado, como resultado de un desequilibrio entre el suministro, formación, consumo y oxidación hepática de ácidos grasos. El consumo incluye la β - oxidación mitocondrial, producción de cuerpos cetónicos o secreción de triglicéridos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Además, muchos modelos animales y estudios en humanos señalan la relación entre obesidad y resistencia a la insulina, un factor patogénico clave en el desarrollo de enfermedades complejas como esteatosis hepática así como el síndrome metabólico (Ayala et al., 2008).

Las modificaciones genéticas y/o los cambios de ciertos factores (hormonales, dietéticos, etc.), constituyen herramientas básicas para el desarrollo de modelos animales, que permiten avanzar en el conocimiento fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de estas enfermedades complejas y sus posibles estrategias terapéuticas.

IV. Planteamiento del Problema

Para el 2006 en la Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT) mostró que el 70 % de la población mexicana padece sobrepeso y obesidad entre los 30 y 60 años.

En México, la Encuesta Nacional de Salud 2012 (ENSA-2012) reportó que los niveles de sobrepeso y obesidad en las mujeres de 29 a 59 años fueron de 36.1 % y 28.1 % y hombres del mismo grupo de 40.9 y 18.6 %. Esto quiere decir que más de la mitad de nuestra población está en riesgo de padecer alguna enfermedad asociada a obesidad y con ellos diversas complicaciones de la misma, aunado a un consumo de dietas hipercalóricas las cuales conllevan a enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, hígado graso, debido a esto científicos se han dado a la tarea de encontrar marcadores moleculares para caracterizar individualmente a personas que aquejan este tipo de enfermedades y antes de aplicar nuevos conocimientos a la población humana, siempre se han realizado los primeros estudios en roedores u otros modelos animales.

La literatura más reciente sugiere que cambios sutiles de expresión génica son ocasionados por el tipo de dieta (Solomon P et al., 2008; Marzetti E et al., 2008; Leidy H et al., 2007; Nandea K et al., 2006; Silva T et al., 2010; Lockard M et al., 2010; Silvia R et al., 2010; Lewis et al., 2010); sin embargo nunca se ha postulado que los cambios de expresión génica de $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$, estén tan directamente ligados con estímulos de dieta hiperlipídica e hipercalórica. En este escrito propongo que los cambios de expresión del RNA mensajero de $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$ se encuentran directamente ligados con estos estímulos y muy probablemente interaccionar entre sí.

En esta investigación se toman estímulos externos que pueden correlacionar la expresión de receptores retinoides ($RAR\alpha$ y $RXR\alpha$) basándose en dietas alta en grasa saturada y alta en calorías, las cuales tienen un comportamiento importante en tejido hepático, ya que el consumo de una dieta grasa representa una serie de cambios metabólicos los cuales dañan un conjunto de órganos comparados con animales sometidos a una dieta balanceada, es por ello que una dieta equilibrada podría revertir ó disminuir el daño hepático, como el que se produce en el hígado graso no alcohólico, el cual es causado por exceso de ácidos grasos en las distintas poblaciones celulares del hígado.

Se busca correlacionar las dietas con los receptores retinoides, como consecuencia principal de daño hepático causado por una mala alimentación en ratas *Sprague Dawley*, para su posterior abordaje en pacientes con predisposición a presentar sobrepeso, obesidad, hígado graso, diabetes tipo 2, dislipidemías etc., aunado a reunir estímulos de dietas altas en grasa y sedentarismo. Ya que $RAR\alpha$ y $RXR\alpha$ se expresan de manera normal en un organismo que se encuentra en homeostasis, participando de manera regular en la adiposidad de mamíferos y metabolismo lipídico, en consecuencia sí un modelo de estudio tiende a caer en el desequilibrio estos receptores se verán afectados causando una problema como baja o alta expresión.

Por lo tanto los factores que determinan el incremento del peso corporal, así como el riesgo de obesidad ya que son tanto factores genéticos como ambientales relacionados con el estilo de vida.

V. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la dieta alta en grasa saturada y alta en grasa más fructosa sobre la expresión génica de RAR α y RXR α en tejido hepático de un modelo animal?

VI. Justificación

En este estudio se toma la importancia de los receptores retinoides, ya que han mostrado cambios in vivo en su expresión génica, lo que es un indicador de posibles alteraciones en el metabolismo lipídico, ya que actúan junto con LXR, SREBP1c, PPAR α , participan en la cascada de señalización, lo cual es importante ya que se espera profundizar en modelos animales y el efecto que conlleva. Los modelos animales buscan proporcionar el medio para buscar lo ya observado mediante la medición del estímulo de la dieta como factor predisponente a la expresión del mismo.

Ya que hoy en día México ocupa el primer lugar a nivel mundial **en obesidad infantil**, el segundo en obesidad en adultos, donde **uno de cada tres adolescentes de entre 12 y 19 años presenta sobrepeso u obesidad, el séptimo lugar en diabetes y el segundo lugar en muerte por esta enfermedad**, confirmado por la Organización Mundial de la Salud. Por ello es necesario saber cuál es el riesgo que implican las dietas altas en grasa y fructosa en la expresión de los genes, en personas con este tipo de alimentación, ya que desconocen el riesgo.

El posible papel de la dieta como factor predisponente a la acumulación de grasa en tejido hepático atrae la atención de investigadores como de la población ya que en los últimos años se sabe que la obesidad conduce a una serie de alteraciones metabólicas. En México ha sido una condición que ha ido aumentando paulatinamente y va dejando estragos conforme a la presencia de complicaciones.

La dieta es uno de los factores ambientales mejor definido, de ahí, que la alimentación inadecuada y, de manera más específica, el consumo de alimentos con alto contenido en ácidos grasos de tipo *trans*, se considere como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Éste, junto con otros como el sedentarismo y la

obesidad, pueden estar presentes desde la infancia y persistir en etapas adultas, dando origen, incluso desde edades tempranas a la formación de estrías grasas en la pared vascular.

La disponibilidad de alimentos a precios relativamente bajos, hipercalóricos y aterogénicos, facilita el consumo, situación que se considera responsable de la variedad de enfermedades asociadas con pobreza y relacionadas con el incremento de la incidencia de diabetes, obesidad, hipertensión y enfermedad vascular aterosclerótica, en ciertos grupos poblacionales.

Por esto, la modificación en el estilo de vida, con una dieta balanceada así como un aumento en la actividad física, mejora significativamente la histología hepática y la resistencia a la insulina, las personas que presentan diferentes trastornos metabólicos pueden prevenir complicaciones y no esperar que sea demasiado tarde para tratar de revertir la historia natural de estas enfermedades complejas. Los modelos animales buscan asemejar el comportamiento de los receptores retinoicos que se expresan en tejido hepático y la medición del estímulo de la dieta como factor predisponente a la expresión del mismo.

El presente estudio buscará analizar el efecto de una dieta hipercalórica e hiperlipídica/alta en grasa saturada en tejido hepático de ratas, el cual podrá servir de modelo para investigaciones futuras en las que se utilicen estímulos antes mencionados.

VII. Hipótesis

Se sabe que los receptores retinoides (RAR α y RXR α) participan normalmente en la modulación de la expresión génica, regulando procesos del metabolismo de lípidos en tejido hepático, por lo tanto, en una dieta hiperlipídica e hipercalórica se alterara esta modulación normal, teniendo como consecuencia la desregulación de estos receptores en tejido hepático, aunado a alteraciones metabólicas importantes en ratas macho *Sprague Dawley*.

VIII. Objetivo General

Determinar el efecto de una dieta hiperlipídica e hipercalórica, sobre la expresión génica de RAR α y RXR α en tejido hepático y su asociación con el aumento de peso corporal, tejido adiposo e indicadores bioquímicos en un modelo animal en ratas macho *Sprague Dawley*

8.1 Objetivos Particulares

- a. Analizar la expresión génica del RNA mensajero de RAR α y RXR α en el hígado de ratas *Sprague Dawley* bajo una dieta hiperlipídica e hipercalórica.
- b. Correlacionar la expresión de los receptores retinoicos RAR α y RXR α , en presencia de (DC) dieta control, (DG) dieta grasa y (DGF) dieta grasa y fructosa en tejido hepático en ratas macho *Sprague Dawley*.
- c. Medir el efecto que causa la dieta alta en grasa y dieta alta en grasa más fructosa sobre el peso corporal, peso total de tejido adiposo (retroperitoneal, epidídimal, subcutáneo y visceral), así como su asociación con los análisis bioquímicos: colesterol y glucosa en las ratas macho *Sprague Dawley*.

IX. Materiales y Métodos.

Se desarrollo un modelo hiperlipídico e hipercalórico en ratas *Sprague Dawley*, el cual se llevo a cabo en el laboratorio del Departamento de gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán. La especie que se empleo fue ubicada y manejada durante todo el periodo experimental en las instalaciones del bioterio del INCMNSZ.

El modelo fue reproducido mediante el abordaje nutricional/dietético que consistió en un régimen de dieta solida alta en grasa más fructosa en ratas no modificadas genéticamente.

9.1 Tipo de estudio: Experimental

Muestra: 24 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus*, de la cepa *Sprague Dawley* (SD)

9.2 Criterios de inclusión: Ratas *Sprague Dawley* (SD), adulto joven de 6 a 8 semanas de edad, todas macho con un peso de 225 ± 25 gramos

9.3 Criterios de exclusión: Animales de distinto sexo o con signos de enfermedad.

9.4 Criterios de eliminación: Las ratas serán eliminadas del estudio si presentan uno o más de los siguientes síntomas; : pérdida de peso corporal $> 25\%$ en siete días, postura encorvada persistente, pilo-erección en todo el cuerpo, respiración con dificultad, saliva persistente, con piel húmeda permanente, tremor y convulsiones continuas (>10 min.), abatimiento persistente (>1 h), distensión abdominal muy pronunciada, no presentar comportamientos espontáneos, sin respuesta a estímulos y muerte espontánea a lo largo del estudio.

9.5 Adquisición de animales: Los animales fueron adquiridos de los laboratorios Harlan en México.

9.6 Acondicionamiento: Durante todo el periodo experimental las ratas se ubicaron y manejaron en las instalaciones del bioterio del INCMNSZ, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), y con un ciclo de 12h de luz/oscuridad. Por tener procedencia externa y de fenotipo similar a los animales en el bioterio, fueron mantenidos separados en el cuarto 11 del primer piso, en un anaquel independiente, en jaulas individuales de piso de malla de alambre y contaran con libre acceso a los alimentos diferentes dietas (Control, Grasa y Grasa más Fructosa) y al agua de beber. Se registró semanalmente el peso a todos los individuos con la ayuda de una balanza digital (marca OHAUS) debidamente calibrada aprobada para este uso. De igual forma fue medido el consumo de alimento (g/kg/d) y de agua (ml/kg/d).

9.7 Consideraciones Éticas: El uso de los animales para este proyecto fue de acuerdo con el reglamento, los manuales y guías de procedimiento del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio, mismo que contiene la Norma oficial Mexicana

NOM-062-Z00-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales. Todo personal registrado y autorizado para trabajar con los animales con los conocimientos, habilidades y experiencia de manejo de animales para realizar las maniobras experimentales descritas en el proyecto.

Los animales fueron sometidos exclusivamente a los procedimientos específicos en este protocolo, y en caso de que hubiera ocurrir cualquier modificación, esta hubiera sido inmediatamente comunicada al CINVA (COMITÉ DE INVESTIGACION EN ANIAMLES), incluyendo el periodo de duración del estudio.

9.8 Tipo de dieta: Se utilizaron 24 ratas *Sprague Dawley* la cuales fueron divididas aleatoriamente en tres grupos de 8 ratas cada uno, sometida a la dieta durante nueve semanas

Dieta control, Dieta grasa y Dieta alta en grasa más fructuosa

9.9 Manejo Dietético: Dieta Control (DC) fueron implementas diariamente en 8 ratas con 100% dieta solida (croqueta PMI 5001 Purina) y 500mL de agua desionizada.

Dieta Grasa (DG) implementada diariamente en 8 ratas con 20 gramos a base de una dieta (croqueta PMI 5001 Purina) molida y adicionada con manteca de cerdo 1:1 y 500 mL de agua desionizada.

Dieta Grasa más fructuosa (DGF) implementada en 8 ratas con 20 gramos diariamente a base de una dieta (croqueta PMI 5001 Purina) molida y adicionada con manteca de cerdo 1:1, y fructosa 12.6 gramos en 500 mL de agua desionizada (25% peso/volumen).

9.10 Cuidados diarios: El tipo de dieta para cada grupo de rata fue administrada diariamente así como un cambio de agua con el fin de tener a las ratas en un medio lo más higiénico posible.

Las jaulas y comederos se limpiaron individualmente así como la medición de peso de cada rata, esto se realizó cada tercer día y se midió el consumo de la dieta y el agua.

9.11 Eutanasia o Sacrificio: Después de 9 semanas sometidas a esta dieta, la programación del sacrificio se realizó en horas laborales, tomándose el peso antes del sacrificio, se anestesiaron con pentobarbital dosis 30-60 mg/kg vía intraperitoneal, la cavidad abdominal fue abierta siguiendo la línea media del abdomen, para posteriormente tomar la sangre total así como órganos de interés en este caso el tejido hepático.

9.12 Obtención de sangre: Durante el periodo de anestesia se abrió a la rata haciendo un corte horizontal de la parte abdominal al pecho, ya abierto el animal se hizo a un lado las vísceras para posteriormente localizar la aorta y con ayuda de una jeringa de 10 ml se tomó aproximadamente de 5 a 10 ml de sangre total y se colocó en tubos vacutainer heparinizados para la obtención de plasma y tubo con gel anticoagulante para obtener suero. El plasma fue separado y centrifugado a 4°C por 15 min. a 3500 Rpm y mantenido a -80°C. Para posterior análisis de química sanguínea de 11 elementos.

9.13 Obtención de Hígado: Se tomó el tejido hepático del organismo cuidadosamente por medio de pinzas y tijeras de disección para posteriormente colocarlo en solución salina. Con ayuda de una balanza analítica se pesó el tejido y después se hicieron cortes histológicos.

9.14 Conservación del tejido: El tejido hepático fue diseccionado con navajas de criostato en láminas delgadas aproximadamente de 4mm y una porción de la fracción central de este fue colocada en cassetes de histología para hacer inclusiones en parafina y después se posterior cortes histológicos.

El sobrante del tejido hepático fue almacenado en tubos (crioviales) para mantenerlos a -70 ° C, hasta su utilización para la extracción de ARN por medio del método de trizol.

9.15 Extracción de RNA total con técnica de Trizol de tejido hepático.

El hígado congelado se homogenizó mecánicamente utilizando la técnica de extracción fenol-tiocianato de guanidina "TRIZOL", siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones, (Tripure, Reagent, Invitrogen, Lote 93780320 Roche, U.S.A). Para las muestras de hígado. Para el RNA total aislado se utilizó agua libre de RNasas para la degradación potencial de la muestra.

9.16 Electroforesis en Gel de Agarosa: Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis horizontal (Cámara de electroforesis Modelo Dowe Pac 3000, Serie 288BR1733, U.S.A), en un gel de agarosa (Agarosa, Sigma, Lote 13H05227, U.S.A) al 1.5 % teñida de bromuro de etidio (C₂₁H₂₀BrN₃, Sigma, Lote 88K9825, U.S.A).

9.17 Lectura en espectrofotómetro (Nanodrop): La lectura de la concentración del RNA total se realizó en el espectrofotómetro (Nanodrop 2000c; Thermo Scientific, Inc, P.O, Box 3411, Silverside Rd Bancroft Building Wilmington, D.E 1980 U.S.A), por medio del Kit Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche AppliedSystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación del RNA obtenido y determinar el grado de pureza (en base al contenido de proteína), la mezcla fue transferida en una celdilla de cuarzo. Posteriormente se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260, 240, 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra en base a la siguiente fórmula.

Concentración de RNA= absorbancia a 260 nm por 0.04 por dilución (250)= RNA mg/mL

Pureza: Exceso de proteína= D.0 a 260 nm/D.0. A 240 nm= $\text{ó} > 2$

Exceso de fenol= D.0 a 260 nm/D.0. A 280 nm= $\text{ó} > 2$

Se considerarán adecuadas aquellas muestras que obtengan un índice de pureza (260/280) de 1.80-2.00.

9.18 Síntesis de cDNA (Transcripción reversa): La amplificación del cDNA se realizó a partir del paquete: “Kit Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit” (Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit; Roche, Diagnostics Corporation P.O, box 50414. 9115 Hague Road Indianapolis, IN 46250-0414, U.S.A) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (cDNA) a partir de una molécula de RNA monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción se utilizo: Transcriptor Fist Strand cDNA Synthesis kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- a. Hacer cálculos
- b. Preparar Mater Mix a la cantidad que se necesite

	1X
Transcriptasa reversa	4ul
Inhibidor de RNasas	0.5ul
Desoxinucleótidos MIX	2ul
Transcriptasa reversa	0.5ul
Total	7ul

La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA a 25°C por 10 minutos seguido de 55°C por 30 minutos y finalmente 85°C por 5 minutos.

Tiempos (desnaturalización, 10 min. a 95 °C, amplificación 10 min. a 55 °C, 5 min. a 85 °C durante un ciclo. Se realizará a partir de la dilución del cDNA, con una concentración de 1000 ng/μl; se utilizaron oligonucleótidos iniciadores específicos y sondas fluorescentes de hibridación (Hybeprobe Library, Roche Diagnostics). La amplificación se realizará en el equipo Light Cycler (Roche Diagnostics) con el siguiente esquema: (preincubación 10 min. a 95 °C un ciclo) y 45 ciclos (desnaturalización 95 °C por 10 s, alineamiento 60 °C por 30 s y extensión 72 °C por 1 s). Se utilizó como control endógeno el gen β-actina (Universal Probelibrar Set, rat. Roche applied-science, 1296 pb) y los datos fueron normalizados con el método 2-ΔCt.

9.19 PCR tiempo real: Y por ultimo para la Cuantificación de la expresión génica de RARα y RXRα mediante la técnica por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real.

La amplificación se llevo a cabo en el equipo LightCycler ® 2.0 Instrument (Roche Diagnostics Corporation, 9115 Hague Road Indianapolis, IN 46256 U.S.A), que por ser un sistema basado en carrusel requirió los capilares “LightCycler ® Topas Capilares (20 μ)” (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). El equipo LightCycler ® 2.0 Instrument analizó muestras mediante el Software LightCycler ® 4.1 Roche Ampplied Science (Roche Diagnostics Corporation, U.S.A).

La amplificación de cada segmento de cDNA correspondiente a cada gen fue obtenida mediante PCR tiempo real, utilizando 2 μl de LightCycler ® TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, empleando 0.2 μl (0.5 μM final), del iniciador de cada gen (Forw y Rev); en el caso de β-actina (β-actina Forw y β-actina Rev), en el caso de RARα (RARα Forw (left) y RARα Rev (Right)) y finalmente RXRα (RXRα Forw (left) y RXRα Rev (Right)); a demás se añadió 0.1 μl de la sonda de tipo TaqMan ® proveniente de la Universal ProbeLibrary ® de Roche ® que detecta el cDNA correspondiente a cada gen; en el caso de β-actina la sonda # 17, para RARα la sonda # 115 y para RXRα LA SONDA # 26.

Para ambos casos se añadió un volumen final de 5 μl correspondientes a 3 μg de DNA genómico y un volumen de 2.5 μl de H₂O grado PCR para completar el volumen final de la reacción que es 10 μl .

De manera que la mezcla Mix para la amplificación fue la siguiente:

Mix 1	RAR α	Mix 2	RXR α	β -Actina
TaqMan	2	TaqMan	2	2
Primer L	0.2	Primer L	0.2	0.2
Primer R	0.2	Primer R	0.2	0.2
Sonda #115	0.1	Sonda #26	0.1	0.1
Agua	2.5	Agua	2.5	2.5
Total	5	Total	5	5

9.20 Análisis estadísticos: Para analizar los datos en expresión génica (PCR tiempo real) se utilizó la Prueba T de Student, ya que la población estudiada siguió una [distribución normal](#), con un tamaño muestral pequeño ($n=8$), para cada grupo, utilizándose una estimación de la [desviación típica](#) en lugar del valor real, por lo que se comprobó que las [medias](#) de dos poblaciones distribuidas en forma normal son iguales (medias paramétricas). Tomando como valores significativos una $p \leq 0.05$.

En cuanto al análisis de las correlaciones entre los receptores retinoides y los tipos de dietas, se usó el coeficiente de correlación ya que esta herramienta nos indica si existe alguna relación directa entre la expresión génica de RAR α y RXR α . En este caso se hizo la correlación entre los receptores como una forma de comparación. Y los valores asignados se denotan con la "r" de relación y son los siguientes para saber si están

relacionados positiva o negativamente, es decir, sin su relación se dirige en una sola dirección.

$r \geq 0.5$ existe correlación positiva

$r = 0.5$ no se puede deducir tal correlación

$r \leq 0.5$ correlación negativa

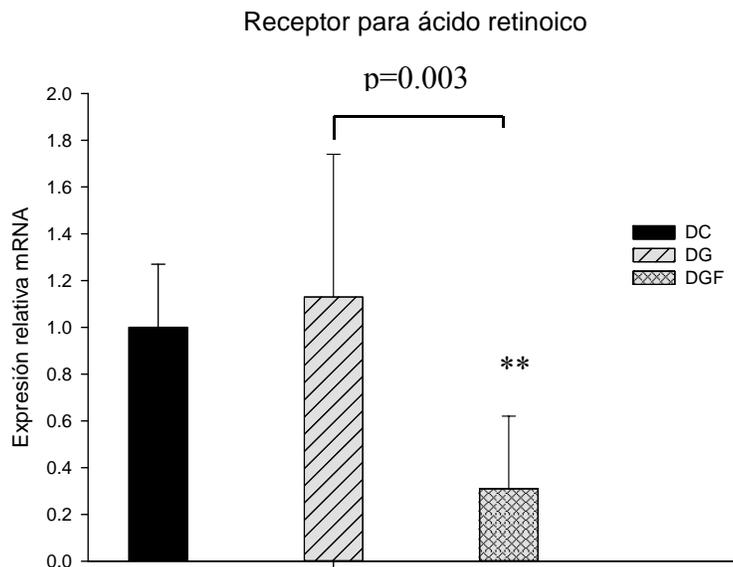
$r = 0$ no hay correlación.

Para analizar los datos del peso de los tres grupos (DC, DG y DGF) en cuanto a la administración de las diferentes dietas durante las nueve semanas y saber su significancia al igual para analizar el tejido adiposo total, se uso la Prueba T de Student ya que estos datos se comportaron como normales y para corroborar se utilizó el método de Kruskal-Wallis, considerado como un [método no paramétrico](#) para probar si el grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al [ANOVA](#) con los datos reemplazados por categorías. Es una extensión de la prueba de la [U de Mann-Whitney](#) para 3 o más grupos, que fue el número de grupos que se utilice, asumiendo bajo la hipótesis nula, que los datos vienen de la misma [distribución](#). Tomando como valores significativos una $p \leq 0.05$

Para los análisis bioquímicos y peso total del hígado se uso la Prueba T de Student y ANOVA, esta para saber si los datos se comportaron normalmente y así poder comparar las medias y los valores entre los tres diferentes grupos, tomando en cuenta que obtuve una $n=8$ para cada parámetro medido. Se tomo valores estadísticamente significativos que fueran ≤ 0.05 .

X. Resultados

Análisis de la expresión génica relativa

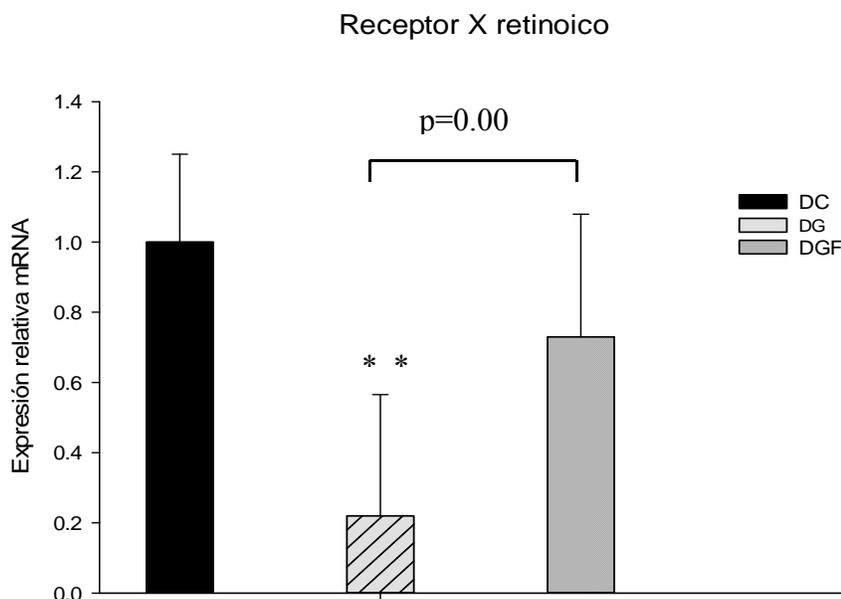


Gráfica 1. Expresión génica relativa de RAR α normalizada por β -actina en hígado de rata macho *Sprague Dawley*. Tratados con diferentes dietas durante nueve semanas. Donde; (DC) Dieta Control = dieta normal (DG) Dieta Grasa = dieta hiperlipídica y (DGF) Dieta

Grasa más Fructosa = dieta hipercalórica. Cada grupo tuvo una n=8. Datos expresados en media±sd.

Se observa en la expresión de RAR α medida en PCR tiempo real, que al comparar la dieta normal contra la dieta hiperlipídica (DC vs DG) no presentan diferencia significativa, sin embargo en la comparación de la dieta normal contra la dieta hipercalórica (DC vs DGF) se presenta una disminución significativa con una *p=0.001, al igual que al comparar la dieta hiperlipídica con la dieta hipercalórica (DG vs DGF) mostrando una disminución significativas con una **p= 0.003. Lo cual nos indica que la expresión del mensajero para RAR α se vio afectado al administrar dietas altas en grasas fructosa (DGF). Tomando valores significativos de p \leq 0.05. Usándose como prueba estadística la T DE STUDE

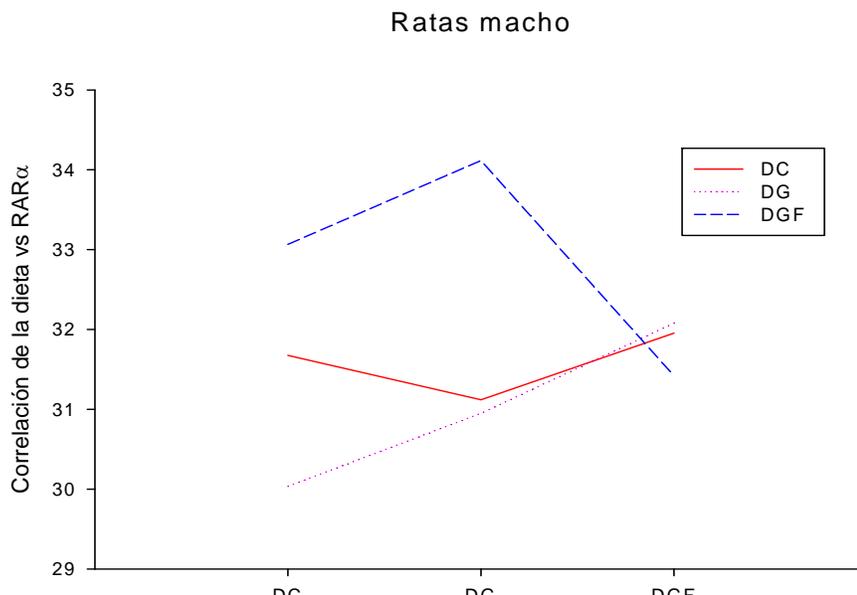
Análisis de la expresión génica relativa



Gráfica 2. Expresión génica relativa de RXR α normalizada por β -actina en hígado de rata macho *Sprague Dawley*. Tratados con diferentes dietas durante nueve semanas. Donde; (DC) Dieta Control = dieta normal (DG) Dieta Grasa = dieta hiperlipídica y (DGF) Dieta Grasa más Fructosa = dieta hipercalórica. Cada grupo tuvo una n=8. Datos expresados en media \pm sd.

Se observa en la expresión de RXR α medida en PCR tiempo real, que al comparar la dieta normal contra la dieta hiperlipídica (DC vs DG) presenta diferencia significativa *p=0.003, en la comparación de la dieta normal contra la dieta hipercalórica (DC vs DGF) no presentaron diferencias significativas lo que indicó que tuvieron un comportamiento semejante y al comparar (DG vs DGF) sí mostró una disminución significativa con una **p =0.002 lo que muestra que en DG disminuye la expresión de RXR α , lo cual nos indica que la expresión del mensajero para RXR α mostró afectación al administrar dietas hiperlipídica (DG). Tomando valores significativos de p \leq 0.05. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT.

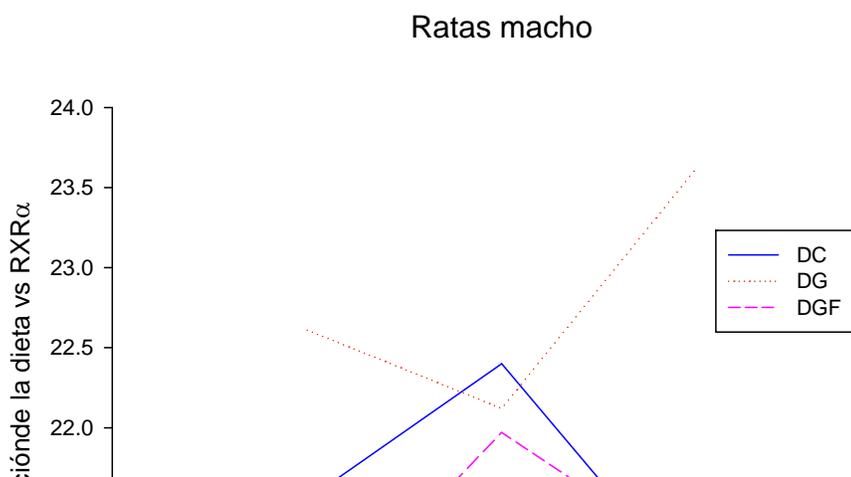
Relación de la expresión de los receptores retinoicos (RAR α) con la dieta



Gráfica 3. Correlación de la expresión génica de RAR α tratados con diferentes dietas durante nueve semanas. Donde DC= dieta normal, DG= dieta hiperlipídica y DGF= dieta hipercalórica, con una n=8.

En la gráfica se muestra el comportamiento de la expresión de RAR α con respecto a las diferentes dietas; donde las tratadas con DG manifiestan un incremento en la expresión del receptor, mientras que el grupo administrado con DGF mostraron un decremento en la expresión del receptor.

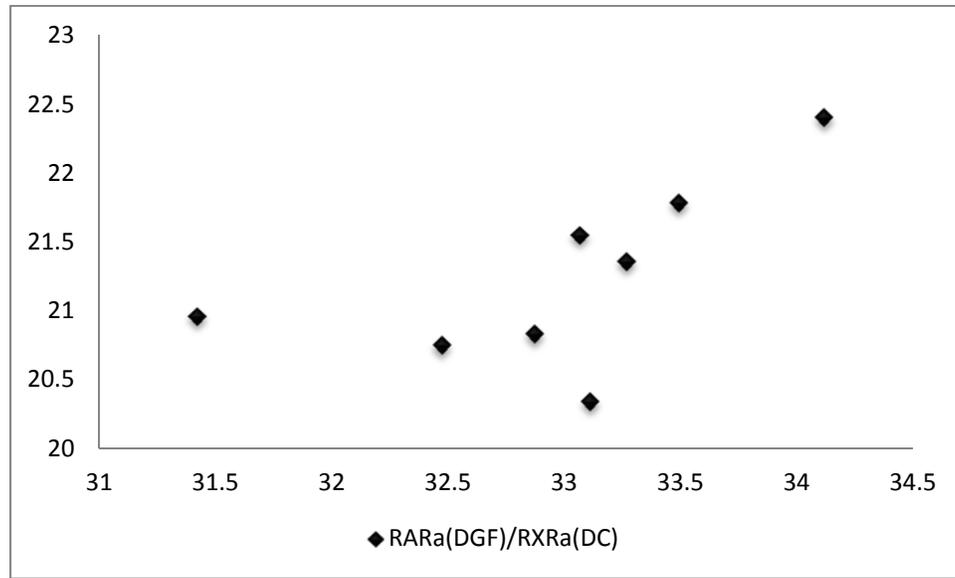
Relación de la expresión de los receptores retinoicos (RXR α) con la dieta



Gráfica 4. Correlación de la expresión génica de RXR α tratados con diferentes dietas durante nueve semanas. Donde DC= dieta normal, DG= dieta hiperlipídica y DGF= dieta hipercalórica, con una n=8.

En la gráfica se muestra el comportamiento de la expresión de RXR α con respecto a las diferentes dietas; donde las tratadas con DG manifiestan un incremento en la expresión del receptor, mientras que el grupo administrado con DGF mostraron un decremento en la expresión del receptor.

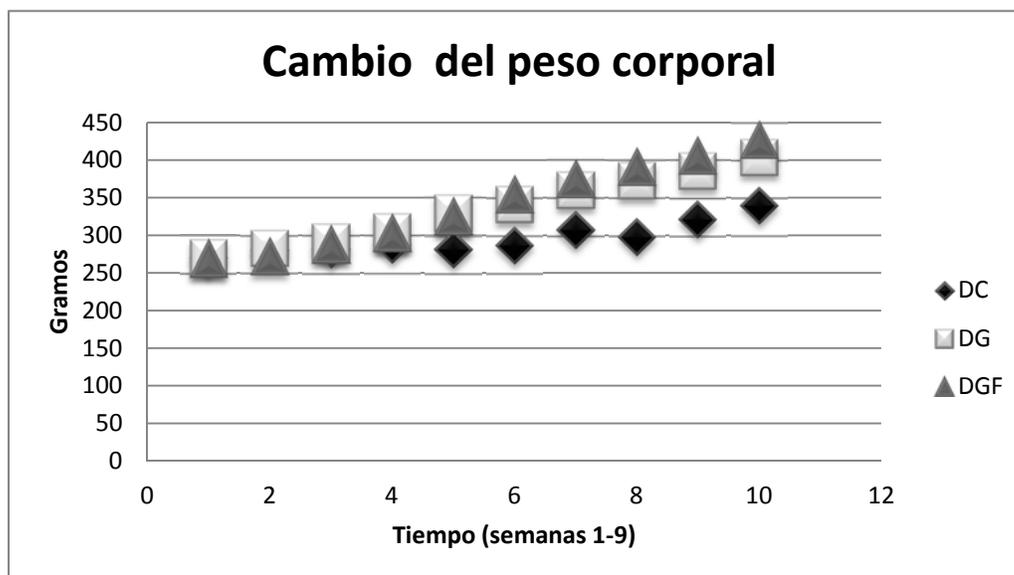
Correlación de la expresión de los receptores retinoicos (RAR α / RXR α) con la dietas



Gráfica 5. Correlación de la expresión génica de RXR α tratados con diferentes dietas durante nueve semanas. Donde DC= dieta normal, DG= dieta hiperlipídica y DGF= dieta hipercalórica, con una n=8.

En la gráfica se muestra se una relación lineal estadísticamente significativa moderada e inversamente proporcional entre los niveles de RAR α (DGF) con respecto a la expresión génica de RXR α (DC); donde la $r=0.6$ con una $*p=0.003$. Donde ambos receptores retinoides están relacionados y seguirían una sola dirección si se encontrarán en condiciones normales, por lo tanto estos genes trabajan juntos formando heterodímeros uno con el otro.

Efecto de la dieta alta en grasa y dieta alta en grasa más fructosa sobre el peso corporal.



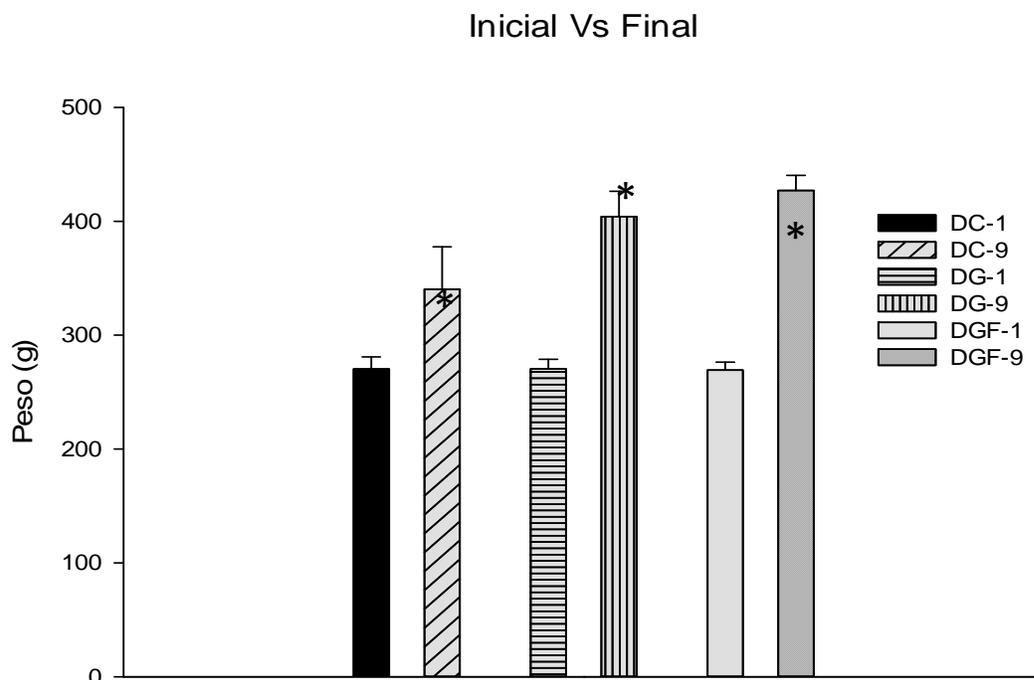
Gráfica 6. Comparación del comportamiento del cambio de peso corporal (gramos) de las ratas machos *Sprague Dawley*. Tratados con diferentes dietas durante nueve semanas (respecto al tiempo). Donde DC= dieta normal, DG= dieta hiperlipídica/manteca y DGF= dieta hipercalórica/manteca más fructosa. Los datos son expresados como media y SD 296.18 ± 32.61 de DC, 334.51 ± 18.14 de DG y 340.85 ± 19.72 de DGF, con una $n=8$ en cada grupo.

Se observa un incremento de peso corporal, conforme transcurrieron las nueve semanas de administración de las diferentes dietas (semana de inicio, semana 1 a la 9), para los diferentes grupos (DC, DG y DGF). A partir de la tercera semana de tratamiento las ratas (DG y DGF empiezan a aumentar de peso con respecto a DC con una $*p=0.03$ Comprobado por el método de Kruskal-Wallis.

Cabe mencionar que en la prueba de homogeneidad de varianzas se encontró una distribución normal. Se analiza un notable aumento en las que fueron alimentadas con dieta grasa más fructosa, que es el punto verde que se observa en la gráfica, esto

significa que el modelo hiperlipídico hipercalórico fue positivo, en cuanto el aumento progresivo del peso en las ratas *Sprague Dawley*. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y método de Kruskal-Wallis.

Comparación de la semana inicial con la semana final en cada dieta

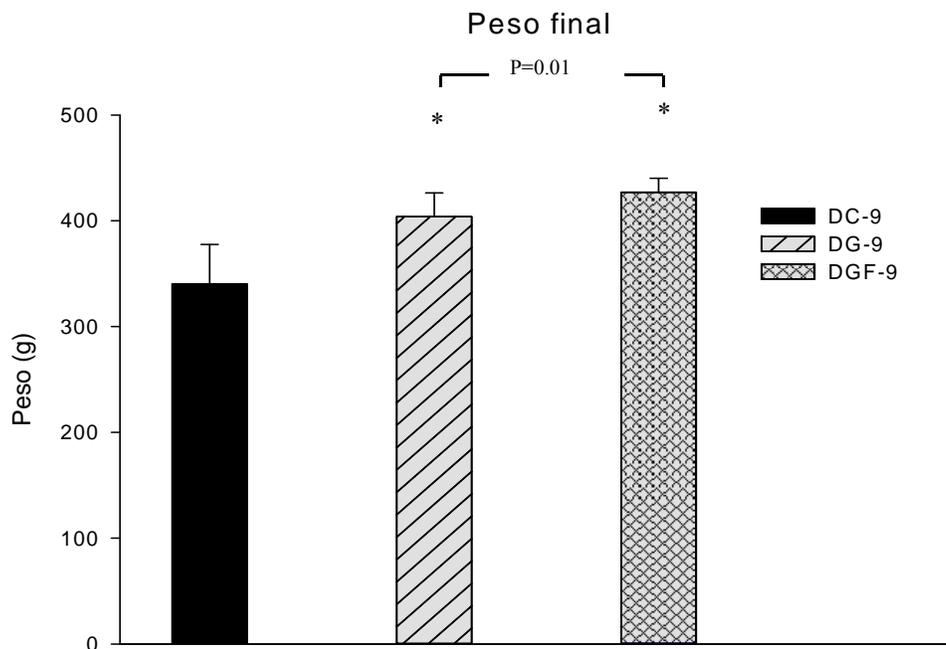


Gráfica 7. Comparación del peso corporal de la semana 1 vs semana 9, peso medido en gramos, cada grupo con una n=8 de ratas machos *Sprague Dawley*. Los datos son expresados como media y desviaciones estándar.

En la gráfica se hace una comparación de la semana de inicio con la semana final del tratamiento con las diferentes dietas (DC inicio vs DC final) (DC inicio vs DC final) (DC inicio vs DC final) con forme transcurren las semanas la rata aumenta de peso para cada tratamiento, las ratas DC al final de la semana destaca un aumento de peso significativo con una $*p=0.004$ lo que nos indica que la rata seguía en crecimiento porque recibía abastecimiento de nutrientes, sin embargo al comparar con el aumento final que

tuvieron las tratadas con las dietas DG y DGF destaca un aumento significativo al comparar con el control DC contra DG; $*p=0.007$, DC contra DGF resulta significativa con un $*p=0.0009$, a pesar que ambas DG y DGF al comparar con el control son significativas, cuando se comparan estas dietas DG contra DGF se observa que una ha tenido mayor peso corporal, las tratadas con DGF con una $*p=0.014$. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y método de Kruskal-Wallis.

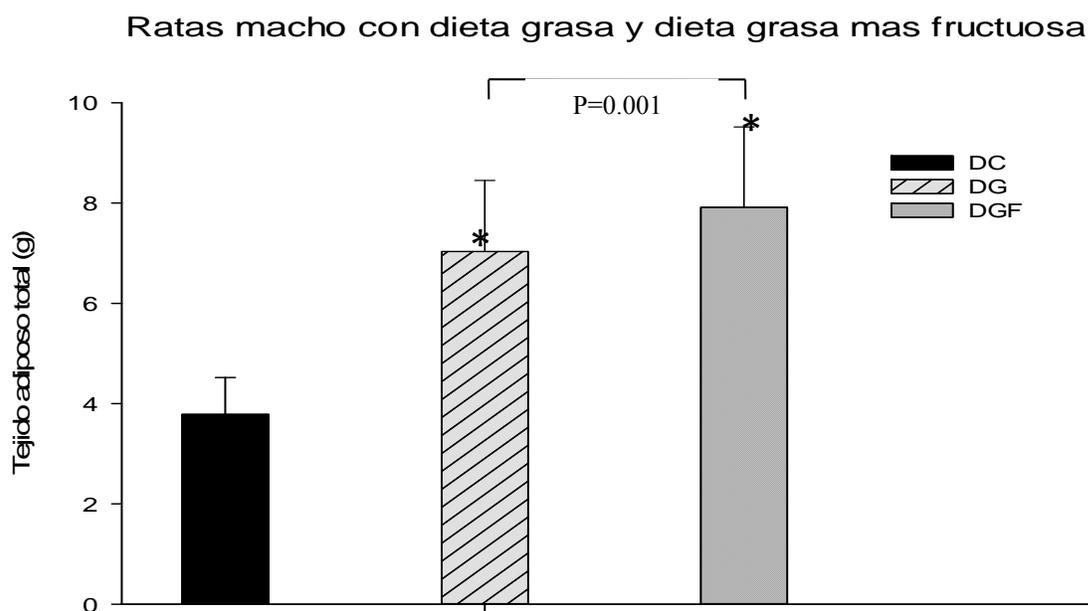
Comparación del peso de los grupos (DC, DG y DGF), al final del tratamiento



Gráfica 8. Comparación del peso corporal de la semana 9, peso medido en gramos, cada grupo con una n=8 de ratas machos *Sprague Dawley*. Los datos son expresados como media y desviaciones estándar.

Se muestra una comparación de la última semana (semana 9) de los tratamientos con las diferentes dietas suministradas (DC, DG y DGF) observándose que al comparar DG y DGF contra el control tienen un aumento significativo con una $*p=0.007$ para (DC vs DG), $*p=0.0009$ para (DC vs DGF) se observa que una ha tenido mayor peso corporal, las tratadas con DGF con una $*p=0.014$. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y método de Kruskal-Wallis.

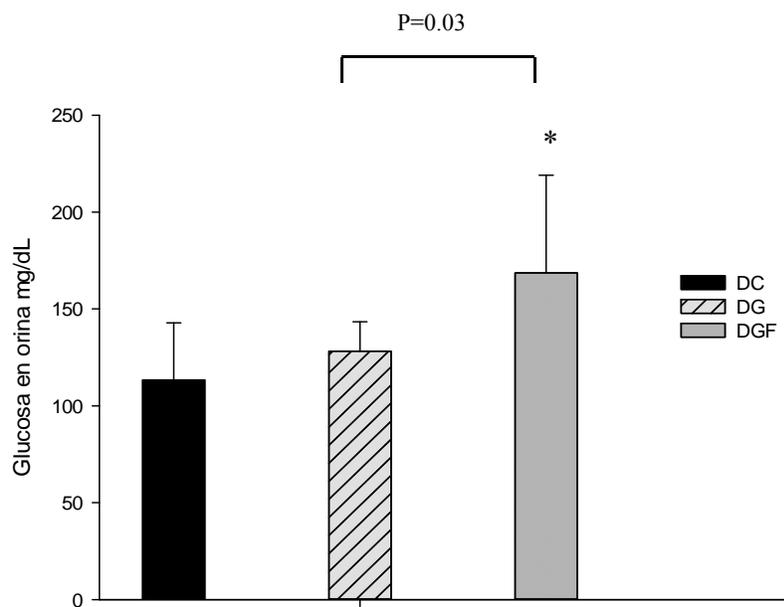
Efecto de la dieta alta en grasa y dieta alta en grasa más fructosa sobre el peso total del tejido adiposo de las ratas macho *Sprague Dawley*.



Grafica 9. Comparación de la grasa total de las ratas después del sacrificio (Tejido adiposo retroperitoneal, Tejido adiposo epidídimal, Tejido adiposo subcutáneo y Tejido adiposo visceral), con un $n=8$ para cada grupo. Las diferentes dietas se administraron durante nueve semanas. Datos expresados como medias \pm SD

Se hace comparación del peso del tejido adiposo total, tomando al final del estudio durante el sacrificio de las ratas, donde el tejido adiposo de las ratas alimentadas con manteca (DG) y las alimentadas con manteca más fructosa (DGF) acumularon una mayor cantidad de ese tejido. Para DG con una $*p=0.03$, y una $**p=0.001$ para DGF, al comparar DG con DGF no muestran significancia ya que en estos el aumento de tejido adiposo fue casi similar. Tomando valores significativos de $p\leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y ANOVA.

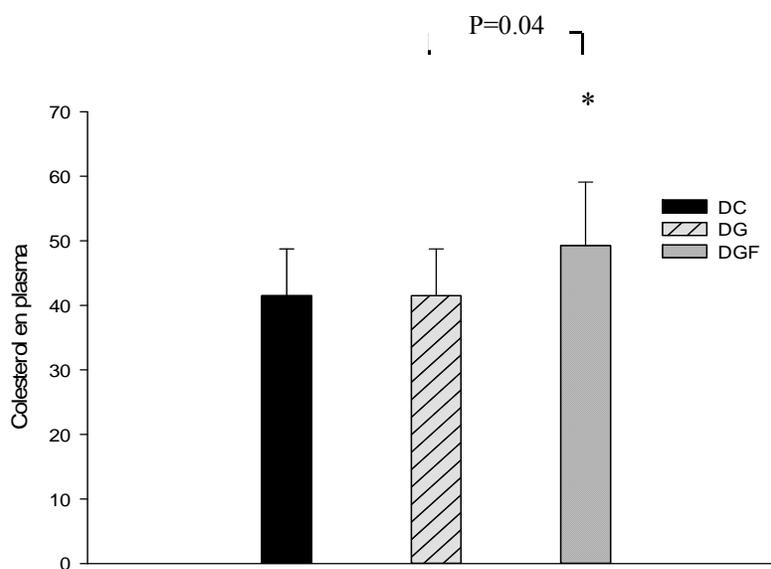
Efecto de la dieta alta en grasa y dieta alta en grasa más fructosa sobre los análisis bioquímicos (Glucosa y Colesterol) en ratas macho *Sprague Dawley*.



Gráfica 10. Composición de glucosa en plasma de ratas macho *Sprague Dawley* después del sacrificio. Respecto a los datos resultantes de concentración de glucosa en plasma. Grupos (DC) Dieta Control, (DG) Dieta Grasa, (DGF) Dieta Grasa más Fructosa, con una $n= 8$ para cada grupo.

Se mostró que los niveles de glucosa fueron incrementando en DGF al comparar con el control con una $*p=0.01$ y (DG vs DGF) con una $*p=0.03$. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y ANOVA.

Efecto de la dieta alta en grasa y dieta alta en grasa más fructosa sobre los análisis bioquímicos (Glucosa y Colesterol) en ratas macho *Sprague Dawley*.

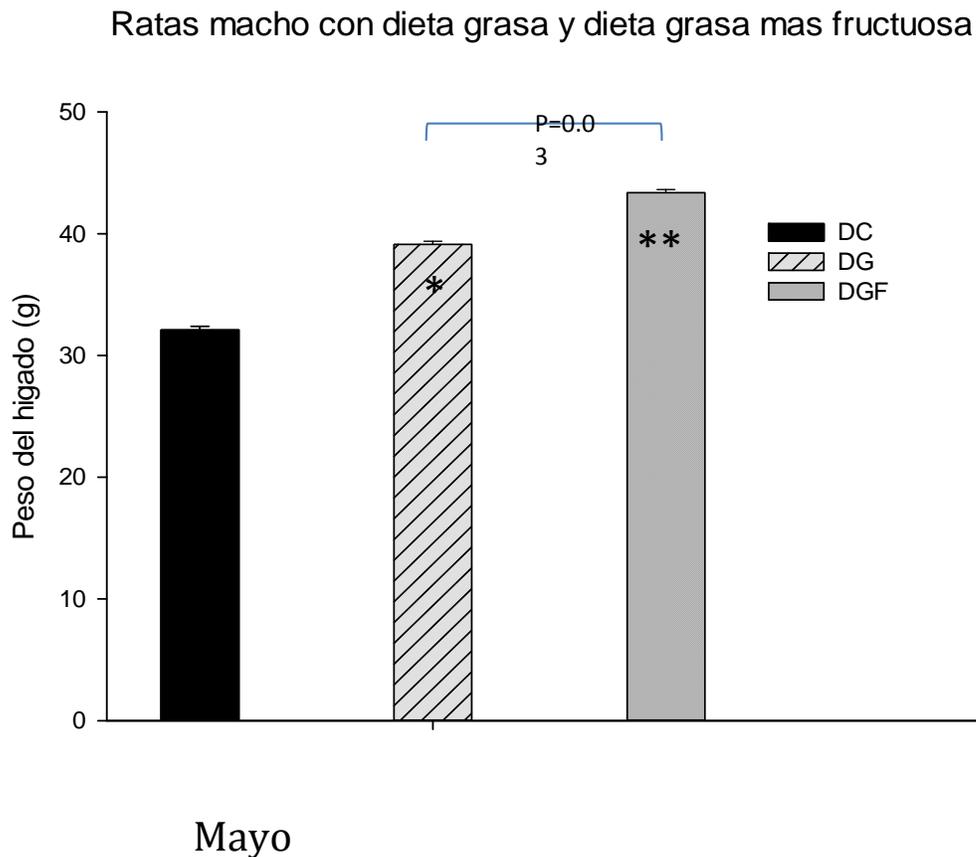


Gráfica 11. Composición de colesterol en plasma de ratas macho *Sprague Dawley* después del sacrificio. Respecto a los datos resultantes de concentración de glucosa en

plasma. Grupos (DC) Dieta Control, (DG) Dieta Grasa, (DGF) Dieta Grasa más Fructosa, con una n= 8 para cada grupo.

Se mostró que los niveles de colesterol fueron incrementando en DGF con una *p=0.04 y (DG vs DGF) con una *p=0.04. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y ANOVA.

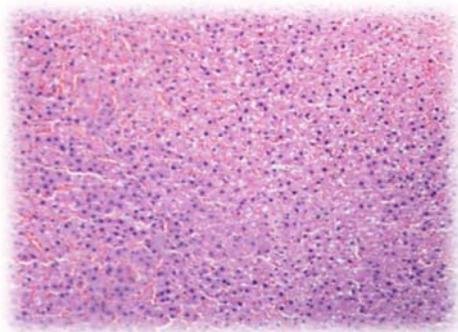
Peso total del hígado



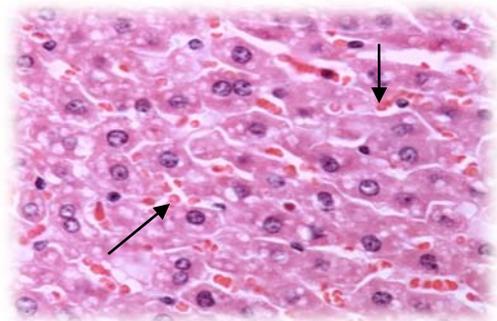
Gráfica 12. Comparación del peso del hígado de las ratas macho *Sprague Dawley*, el tejido se tomó después del sacrificio. Grupos (DC) Dieta Control, (DG) Dieta Grasa, (DGF) Dieta Grasa más Fructosa, con una n= 8 para cada grupo.

Se muestra la comparación del peso del hígado de cada grupo (DC, DG y DGF). En donde las ratas alimentadas con grasa y grasa más fructosa resultan tener un mayor peso en el tejido hepático. Donde DG mostró una *p=0.01, DGF siendo la *p=0.03 y (DG vs DGF) con una **p=0.003 obteniendo valores significativos. Tomando valores significativos de $p \leq 0.05$. Usándose como prueba estadística la T DE STUDENT y ANOVA.

Histología

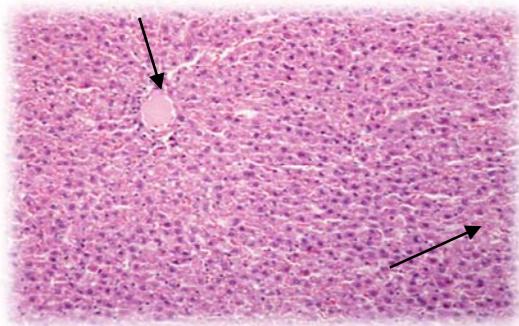


a) Tinción del grupo (DC) 10X

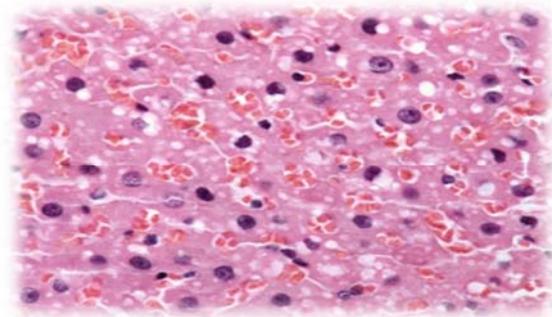


b) Tinción del grupo (DC) 40X

Figura 8. Tinción con hematoxilina-eosina y rojo oleoso de tejido hepático en ratas *Sprague Dawley* del grupo Dieta Control (DC).

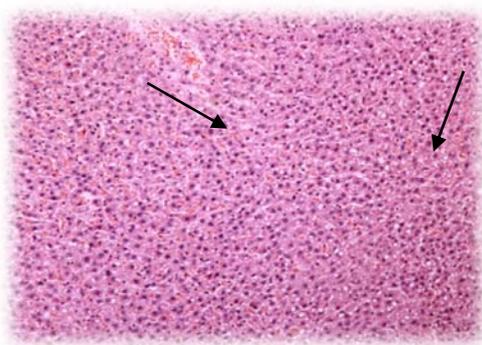


a) Tinción del grupo (DG) 10X
40X

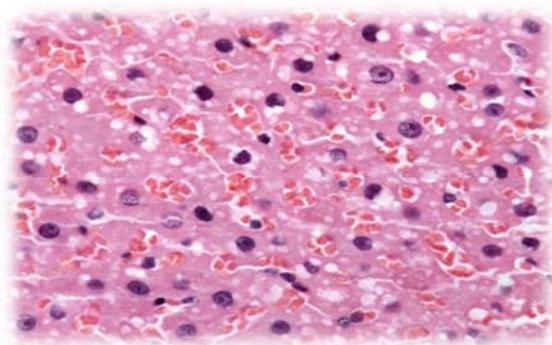


b) Tinción del grupo (DG)

Figura 9. Tinción con hematoxilina-eosina y rojo oleoso de tejido hepático en ratas *Sprague Dawley* del grupo Dieta Grasa Fructosa (DG).



a) Tinción del grupo (DGF) 10X



b) Tinción del grupo (DGF) 40X

Figura 10. Tinción con hematoxilina-eosina y rojo oleoso de tejido hepático en ratas *Sprague Dawley* del grupo Dieta Grasa Fructosa (DGF).

Se observó mayor cantidad de color rojo a las ratas que se les administró DG, (Figura 13) y DGF (Figura 14), en comparación con DC (Figura 12), indicando mayor presencia de grasa acumulada en los hepatocitos (células del hígado). El rojo oleoso tiñe las gotas de grasa que se acumulan en los hepatocitos.

XI. Discusión

El tipo de grasa influye en la síntesis de colesterol y metabolismo del hígado. El desarrollo de esteatosis hepática o acúmulo de grasa en el hígado se produce como resultado de un desequilibrio entre el suministro, formación, consumo y oxidación hepática de ácidos grasos, se planteó que al consumir una dieta con manteca de cerdo y fructosa las dietas pudieron tener un acúmulo de grasa en el hígado además de un aumento considerable en el peso final a los diferentes dietas con respecto al control, sin embargo, solo se obtuvo un aumento en la expresión génica del gen RAR α con respecto a las dieta grasa y grasa mas fructosa (Alemán G et al., 2004). Es por ello que la ingesta excesiva de lípidos o carbohidratos además de llevar a un aumento de peso corporal y acúmulo de grasa en diferentes partes del cuerpo que es donde se tiende a almacenar grasa, no se sintetiza normalmente y conlleva a la baja expresión de genes que regulan procesos de metabolización de un organismo (Comuzzie AG et al., 1998).

La intervención de RAR α y RXR α en diversos procesos como son metabolismo de lípidos y glucosa, inflamación y cicatrización, al activarse provocan una disminución de tejido adiposo así como evitar el proceso de obesidad (Blomhoff R et al., 1994). En esta investigación se trabajó con ratas *Sprague Dawley* ya que es una de las especies predisponentes a desarrollar esteatosis hepática (Orfanos CE et al., 1997). Existen diferencias significativas en estudios realizados en humanos y animales de acuerdo a la expresión de genes cuando se activan RAR α y RXR α , manifestando los resultados que arroja este estudio, la dieta alta en grasa y alta en grasa más fructosa disminuyendo la expresión de RAR α .

En este estudio pude analizar que además de que estímulos ambientales al igual que la alimentación impactan sobre la expresión de genes clave para la regulación del metabolismo energético (Alemán G et al., 2004). Algunos autores resaltan la importancia de los efectos genéticos en la determinación de la grasa corporal en respuesta a alteraciones crónicas en el balance energético y una variedad de genes que regulan el metabolismo en los adipocitos pueden predisponer al desarrollo de sobre peso y obesidad (Orfanos CE et al., 1997).

El avance en el conocimiento ha sido notable en este campo. Actualmente se sabe que existen varios genes capaces de causar estas enfermedades metabólicas complejas o del aumento a la susceptibilidad de desarrollar y los receptores nucleares RAR α y RXR α intervienen dimerizando con otros genes o entre sí en la síntesis de oxidación de ácidos grasos, así como en el almacenamiento. Se han realizado diversos estudios tanto en humanos como en modelos animales en los cuales se administran dietas altas en grasa sin embargo no existen muchas evidencias donde combinen o adicionen fructosa en el mismo plano (Redonnet A et al., 2008). En este caso se realizo la combinación de manteca mas fructosa y se observo que las ratas administradas con esta combinación aumenta significativamente los niveles de glucosa en orina.

Es por ellos dar continuidad a estas investigaciones utilizando diferentes parámetros como porcentaje de grasa total así como estudios patológicos específicos enfocados en la presencia de esteatosis hepática (hígado graso no alcohólico).

Debido a las dificultades con las pruebas en humanos, varios modelos animales han desarrollado para este fin, caracterizado principalmente de la siguiente manera en: el hígado graso genéticamente alterados o ratas alimentadas con dietas elevadas en grasa y en este causa adicionada y mas fructosa además de diversos estímulos causantes de un acumulo de grasa en el hígado, es por ello que este estudio se enfoca en probar el efecto consumo excesivo de grasa (manteca de cerdo) además de adicionando fructosa diluida en el agua que bebieron las ratas del tercer grupo, tomando en cuenta que son estímulos a los que la mayoría de la población mexicana está expuesta, a pesar de que el sedentarismo sigue siendo un problema de salud pública (Astrup A et al., 1994).

XII. Conclusiones

- a. 1.- El receptor $RAR\alpha$ sufre una disminución significativa en su expresión génica, producida por la ingesta de grasas y azúcares refinados (DGF).
- a. 2.- El receptor X retinoide ($RXR\alpha$) se ve alterado por una dieta alta en grasa, produciendo una baja en su expresión génica.

b. -Existe una relación lineal estadísticamente significativa moderada e inversamente proporcional entre los niveles de $RAR\alpha$ (DGF) con respecto a la expresión génica de $RXR\alpha$ (DC); donde la $r=0.6$ con una $*p=0.003$. Por lo tanto ambos receptores retinoides están relacionados, si se encontrarán en condiciones normales seguirían una sola dirección, por lo tanto estos genes trabajan juntos formando heterodímeros uno con el otro.

c. 1.- En el transcurso de las primeras semanas del tratamiento, los tres grupos (DC, DG y DGF) mostraban un incremento similar en cuanto a peso corporal. A partir de la tercera semana de tratamiento las ratas (DG y DGF) empezaron a aumentar de peso con respecto a (DC). Al final de la administración con las diferentes dietas las ratas alimentadas con grasa y grasa más fructosa (azúcar refinado) incrementaron significativamente su peso, sin embargo, las ratas que elevaron más su peso fueron las DGF, con un aumento significativo.

c. 2.- El tejido adiposo de las ratas alimentadas con grasa (DG) y las alimentadas grasa más fructosa (DGF) acumularon una mayor cantidad de tejido adiposo.

c. 3.-Se mostró que los niveles de glucosa y colesterol fueron incrementados significativamente en DGF.

c. 4.- Las ratas alimentadas con grasa (DG) y grasa más fructosa (DGF) resultaron tener un mayor peso en el tejido hepático en comparación con las ratas control. Lo que se mostro de igual manera en la histología ya que acumularon mayor deposito de grasa en las células hepáticas.

XIII. Sugerencias

Medir la expresión génica de algunos otros receptores o ligandos específicos que interactúan con RAR α y RXR α en la cascada de señalización de procesos metabólicos, con la finalidad de analizar el porque de su desregulación (lipólisis o lipogenesis) a partir de diversos estímulos.

Analizar la expresión los receptores retinoides en personas que sufran algún tipo de trastorno metabólico como: sobre peso, obesidad, diabetes, hipertensión, hígado graso no alcohólico entre otras.

Identificar cambios o posibles mutaciones que sufren regiones específicas en los receptores retinoides a través de técnicas como ingeniería genética.

Este estudio proporciona información valiosa para dar continuidad a futuras investigaciones acerca del metabolismo lipídico.

XIV. Bibliografía

- Ackroff Karen, Anthony Sclafani, 2011, Rats preference for high fructose corn syrup vs. sucrose and sugar mixtures, Instituto National of Hearth, p 1-11.
- Ayala I, Cámara P., Fernández Pardo J., Flores I., Cascales A. I., García Pérez B. et al., 2008, Modelos Animales Experimentales de Enfermedad de Hígado Graso y Síndrome Metabólico., An. Vet. Murcia, p 5-16.
- Aldasoro Carlos, marzo 2011. Ingestion de lípidos Bioquímica metabólica, p 1-3.
- Aparato Digestivo y su funcionamiento, 2008, National Institute of health (NIDDK).
- Alemán G, Torres y Torres N, 2004, Los receptores retinoicos RAR y RXR, presentes en el desarrollo de Obesidad y Resistencia a la insulina, Rev Invest Clinic, p 351-367.
- Apuntes de Medicina Facultad de Medicina de la UNAM: <http://www.facmed.unam.mx>.
- Amengual J, Petrov P, Bonet L, 2012, Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 fatty acid oxidation by retinoic acid in hepG2 cells, The international Journal of Biochemistry & Cells Biology, p 2019-227.
- Astrup A, Buemann B, Western P, Toubro S, Raben A & Christensen NJ (1994) Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. Am J Clin Nutr 59, p 350–355.
- Bailey AE. 1980. Aceites y grasas industriales. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- Barne RM, 2002. The large intestine in Nutrition and Disease, Bruselas: Instituto Danone.
- Benyon S, 2001, Metabolismo de los carbohidratos y energético. En, Lo Esencial en Metabolismo y Nutrición. Cursos “Crash” de Mosby. Harcourt, Madrid.
- Benyon S, 2003, Producción de NADPH. En, Lo Esencial en Metabolismo y Nutrición. Cursos “Crash” de Mosby.. Harcourt, Madrid.
- Benyon S, 2005 Metabolismo de las proteínas. En, Lo Esencial en Metabolismo y Nutrición. Cursos “Crash” de Mosby. Harcourt, Madrid.
- Belitz, W. Grosch, 2009, *Food Chemistry*, 4ª Ed. sec: *edible fats*, p 640.
- Bonilla, A. Redonnet, 200, High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver, British Journal of Nutrition, p 665-671.

- Bourges H, Casanueva E, Rosado JL, 2005, Recomendación de ingestión de Nutrientes para la población Mexicana. Bases Fisiológicas, Editorial Médica Panamericana, México, p 25-33.
- Blomhoff R, 1994: Vitamin A in health and disease. New York, NY: Marcel Dekker.
- Bruce Alberts, Bray Dennis, 2006, Introducción a l Biología Celular, Médica Panamericana, Buenos Aires, 2ª Edición, p 267-270.
- Burns KA, Vanden Heuvel JP, 2007, Biochim Biophy Acta, Modulation of RAR AND RXR activity via phosphorylation, p 952.960.
- Burr GO, Burr MM. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat fromthe diet.
- Campbell, Jane B. Reece, 2007, Biología, Editorial Médica Panamericana, Septima Edición, p 362-364.
- Carrera de Licenciatura en Enfermería: UNNE, Capítulo XII- Sistema Digestivo, p 99-120.
- Curi, R., N. S. Hell, C. Timo-laria, 1990, Meal-feeding and physical effort. 1. Metabolic changes induced by exercise training. Physiol Behav, p 869-873.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, 2009, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med; p 509-5017.
- Comuzzie AG & Allison DB 1998. The search for human obesity genes. Science 280, p 1374–1377.
- Diaz Zagoza Juan, 2007. Bioquímica un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida, Mc Graw Hill Interamerican, p 99-102 y 131-135.
- Donald, Voet Judith G, 2006, Bioquímico, Editorial Médica Panamericana, 2ª Edición, p 977-993.
- Dony Ein, Chin Fung Kelvin Kan, 2013, High-fructose diet down regulates long-chain acetyl-CoA synthetase 3 expression in liver of hamster via imparing LXR/RXR signaling pathway, Journal of lipid, p 1241-1254.
- El Plato del bien comer, Dirección General de Promoción a la Salud. Consultada en septiembre del 2013, Disponible en: http://www.promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/programas/3_manual_identidad_plato_bien_comer.pdf.
- Enerback, S, 2011, Brown adipose tissue in humans, Ints Obes, pp342-347.
- Enig Mary, (2000), "*Know your Fats*", p 135.

- Ensminger AH, Ensminger ME, Konlande JE, Robson JRK, Biol Chem, p 345-346.
- Esquivel Solís Vivian, Georgina Gómez-Salas, 2007, Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa, AMC, vol 49, No 4, p 198-201.
- Evans RM, 1988: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: p 889-895.
- Fieser LF y Fieser M, 2004, Química Orgánica Fundamental. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- Franciscus Alan, 2012, Introducción sobre el hígado, El VHC y el hígado, <http://www.hcvadvocate.org/>, p 1-4.
- Fristsch, Helga, 2008, Atlas de Anatomía de Órganos internos. Editorial Médica Panamericana, p 12-25.
- Gentile, C. y Pagliassotti, M. 2008. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. vol. 19: p 567-576.
- Gil Hernández Ángel, 2010, Tratado de Nutrición, Tomo I Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Editorial Médica Panamericana, 2ª Edición, p 751-752.
- Gonzales de Buitrago y otros, 2001, Bioquímica Clínica, Gastrointestinal and liver disease, 7a ed- tomo 2 Saunders McGraw Hill.
- Grasas y Ácidos grasos en nutrición humana, 2012, Estudio FAO, Alimentación y Nutrición, Fundación Iberoamericana de Nutrición.
- Guyton, 2006, Tratado de Fisiología Médica; 11 Edición, Editorial Elsevier España
- Grasas comestibles naturales: Manteca de cerdo y sebo Disponible en: www.elergonomista.com/alimentos/manteca (Revisado el 10/12/2007).
- Harper HaroldnAntony, 2001, Bioquímica de Harper, editorial el manual moderno, pp187-190 y 175- 180.
- H. Aron. Über den nährwert, 1918, (On the nutritional value). *Biochem*, p 211-233.
- Heikki, Savolainen, 2004. El cuerpo humano-Aparato Digestivo, Enciclopedia de Salud.
- Hicks JJ, 2001. Bioquímica. Mac Graw-Hill Interamericana.
- Hicks J, 2004. Glucólisis, Glucógeno: metabolismo y sus alteraciones. Gluconeogénesis.
- Hicks Gómez Juan Jose, 2007. Bioquímica segunda edición, Mc Graw Hill, p 124-127 y 137-140.
- Highleyman Liz, Franciscus Alan, 2008, Introducción sobre el Hígado, Hepatitis C Support Project, Versión 1.0, p 1-2.

- Izquierdo, A. y Gómez G. 2011 El papel de la lipotoxicidad en el desarrollo de la lesión renal en el síndrome metabólico y el envejecimiento. *Diálisis y Trasplante*, p 1-8.
- Johnson Lr, 2001, *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3a Edición New York, Raven press.
- Johnson N, Sachinwalla T, Walton D, Smith K, Armstrong A, George J., et al., 2009, Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology*, p 1105-1112.
- Johnson Richard, 2010. The effect of fructose on renal biology and disease, *Revista Science in renal medicine*, vol 21, p 2036-2039.
- La función Hepática, 2007, *Oclu-Salud*, N° 74, p 38.
- Lee WM: Acute liver failure. 2000, *The New England Journal of Medicine*.
- Levi, B; Werman MJ (1998). Fulltext "Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats, p 1442-9.
- Maaix José, Verdú, Bases Fisiológicas-Sistema digestivo Capitulo 1, pp 3-18.
- Melanson, K.; et al. (2006). "Eating Rate and Satiation." *Obesity Society (NAASO) 2006 Annual Meeting*, October 20-24, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts.
- Méndez, N. Chávez, N. Uribe, M. 2004. Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. *Medigraphic artemisa*. vol. 140, No. 2: p 67- 72.
- Mijas De La Torre, 2002, *Técnicas y Métodos de Investigación en Nutrición Humana*, Editorial Glosa, S. L., 2ª ed, México.
- Mitsuru Ohata, Masayoshi Yamauchi, 2000, RAR and RXR expression by kuppler cells, *Experimental and Molecular Pathology*, p 13-20.
- Nelson y Cox, 2008 *Lenhinger principios de bioquímica*. Editorial Omega. Ediciones varias.
- Netler, 2009, *Anatomía Humana Sistema Digestivo*, Editorial Masson
- Nutriweb: Tu mundo de nutrición Disponible en: www.es.geocities.com/bonidavi/nueva/nutri11. (Revisado el 08/12/2007).
- Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond-Roesler B, Geilen CC, 1997: Current use and future potential role of retinoids in *Dermatology*. *Drugs* 53: p 358-388.
- Orristal, Linda (Fall 2001). "The Murky World of High-Fructose Corn Syrup"
- Pérez Cruz Elizabeth, 2007, Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructuosa, *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 15 No. 2: p 67-68.

- Pérez Lizaur, AB, Marvan Laborde L, 2005, Manual de Dietas Normales y Terapéuticas. Ed. Prensda Médica. 5ª ed. México, p 12-22.
- Pintor-Fontanillo JA, Carbajal Azcona A, 2003, La dieta equilibrada, prudente o saludable. Nutrición y Salud. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Nueva Imprenta, S.A., vol 1.
- Plazze Alvaro, Fiolgia del Aparato Digestivo, 2009, Apartado Médico, pp 2-31
- Ramírez Mayans J.A, García Campos M, Cervantes Bustamante R, 2003, Transición alimentaria en Mexico, An Pediatr, p 568-573.
- Redonnet A, Ferrand C, Bairras C, 2008, Synergic effect of vitamin A and high-fat diet in adipose tissue development and nuclear receptor expression in young rats, British Journal of Nutrition, p 722-723
- Renaud, J.P., Moras, D. 2000, Strucural studies on nuclear receptors. Cell. Mol. Life Sci. 57, p 1748-1769.
- Reyes Marcela, 2012, Características Biológicas del Tejido Adiposo, Universidad de Chile. Sharman, M.R, 2006, Polavarapu R, Transcriptional networks in a rat model for nonalcoholic fatty liver disease: a microarray analysis, p 202-210.
- Segarra Espinoza Edgar, 2006, Fisiología de los Aparatos Digestivos, Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas, p 98-118.
- Stine M. Ulven, Vasanti Naturanjan Kirsten B. Holven, 1998, Expression of retinoica cid receptor and retinoid x receptor subtypes in rat livercells: Implications for retinoid signalling in parenchymal, endotelial kupper and stellate cells, European Journal of cell Biology, p 111-116.
- Tang G, Russel RM, 1990: 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipd Res* 31: 175-182.
- Teff, KL; Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ, 2004. "Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women". *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (6): 2963-72.
- The Ensminger AH, Ensminger ME, Konlande JE, Robson JRK. La Quimica de lipidos y carbohidrato.
- Tiniakos, D. Vos, M. Brunt, E. 2010. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. *The Annual Review of Pathology.* vol. 5, p 145-171.

- Valenzuela, R. Espinoza, A. González Mañán, D. D'Espessailles, A. Fernandez, V. Videla, L. Tapia, G. 2012. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. Plos one. vol.7, p 1-8.
- Wensaas A. J., Rustan A C., Roling-Andersen M. H., Caesar R., Jensen J., Kaalhus O., Drevon C. A., et al., 2009. Dietary supplementation of tetradecylthioacetic acid increases feed intake but reduces body weight.

XV. Anexos

Anexo 1

De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación.

Artículo 121. En la investigación experimental con animales, referidas a la salud humana, se deberán llenar los requisitos que establezcan las normas propias institucionales de salud, autorizadas por la Secretaría de y satisfacer lo señalado en este capítulo.

Artículo 122. Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

Artículo 123. Cuando sea necesario sacrificar a un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

Artículo 124. Los bioterios deberán estar de acuerdo con la especie, conformación corporal, hábitos, preferencias posturales y características locomotoras de los animales, para proporcionarles comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen otras situaciones.

Artículo 125. Los bioterios de producción o mantenimiento crónico serán supervisados por profesionales calificados y competentes en la materia y deberán permitir el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales, de conformidad con las normas que la propia institución emita.

Artículo 126. El titular de la institución de salud en donde se realice la investigación a la que se refiere este capítulo, deberá establecer y vigilar el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales, así como las medidas de profilaxis y vacunación necesarias para la protección del personal ocupacionalmente expuesto

Anexo 2

Características de las Ratas *Sprague Dawley*

Modelo general para el estudio de la salud humana y la enfermedad, esa rata sirve como excelente modelo para la toxicología, reproducción, farmacología, la investigación y áreas de comportamiento.

Características de interés	Uso en investigación
Hiperleptinemia	Para regular presión arterial
Hiperfagia	Se adaptan a diferentes tipos de dietas
Hipertension	Aumento en tejido graso
Resistentes a Leptina	Efectos hormona Efectos musculares Efectos neurológicos Efecto Prevención/Reversión Expresión fenotípica Estres

Cuadro. Características de interés para la reproducción de un modelo animal. Tomado de Harlan Laboratorios, Disponible en: www.harlan.com, 2008.

Anatomía y Fisiología.

Peso corporal en adultos: 250-300g (hembra); 450-520 (macho)

Vida útil: 2.5 a 3.5 años.

Frecuencia respiratoria: 70 a 115 respiraciones por minuto

Frecuencia cardíaca: 250 a 450 latidos por minuto.

-La fórmula dentaria es de $2 = 16$ incisivos que se encuentran de raíces y crecen continuamente.

-El esófago hacia el estómago en la curvatura menor a través de un pliegue de tejido del estómago. Debido a esta disposición anatómica, la rata no es capaz de vomitar.

-Al igual que el caballo, la rata no tiene una vesícula biliar.

-El pulmón izquierdo consta de un lóbulo, el pulmón derecho se compone de cuatro lóbulos.

-Las ratas tienen cinco pares de glándulas mamarias. Distribución de tejido mamario es difusa, que se extiende desde la línea media ventral por los flancos, el tórax y parte del cuello.

-La rata responde a la disminución de la temperatura ambiental por termogénesis sin escalofrío, y el aumento de la temperatura ambiental mediante el aumento de la vascularización de su larga cola, que puede servir como órgano de regulación térmica.

-Se utiliza rata macho por el escás de procesos hormonales propios de las ratas hembra, lo que facilita el tratamiento.