



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad de Estudios Superiores de Iztacala

**“Expresión transcripcional de moléculas
inflamatorias (IL-10, IL-6 y TNF-[alfa]) en hígado de
conejo (*Oryctolagus cuniculus*) alimentados con una
dieta enriquecida en ácido palmítico.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O

PRESENTA

Ariadna Velázquez Mata

Asesor de Tesis:

M. en C. Juan Alberto Ponciano Gómez



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016.



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.

“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las
mismas cosas”

“El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información”

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la
energía atómica: voluntad”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible ya que estuvo dentro del marco de los proyectos DGAPA-PAPIMA-PE207516 y PAPIME-PE104814.

Esta labor significa no sólo el producto mismo, sino una suma de esfuerzos y la (por fin) culminación de una etapa. Es un escalón o un engrane. Gracias a todas aquellas personas que directa o indirectamente apoyaron para su realización.

A Beto (M. en C. Juan Alberto Ponciano Gómez), mi asesor y amigo, que fungió como mi guía, facilitador, profesor, enciclopedia andante, calmante. No tengo palabras para poder agradecerte.

Al M. en C. Santiago Sigrist por permitirme ser un granito de arena en el proyecto y por los comentarios al trabajo y por enseñarme y evaluarme en las técnicas (reiteraré que lejos de hacer importa el ser).

Al Dr. Rafael Jiménez por permitirme insertarme en los trabajos del laboratorio, por cuestionarme mis ideas y por la revisión del trabajo.

Al Dr. Elías Piedra no sólo por la revisión del trabajo y aporte de comentarios, sino también por sus enseñanzas a lo largo de mi formación profesional. Gracias por contribuir a desarrollar en mí el pensamiento crítico, analítico, por enseñarme a cuestionarme ¿Qué pasaría si...?, por mostrarme cómo leer entre líneas, cómo leer el comportamiento de los “bichos”, y sobre todo por su entrega y humildad.

Al Dr. Miguel Murguía, por sus comentarios, por atender a la razón y escuchar entre líneas las palabras valiosas.

A la Dra. Julia por sus comentarios al trabajo y porque los detalles le dan la belleza a lo que uno hace.

A los conejitos que con su vida contribuyeron a la generación de resultados.

A los que se hicieron cargo de los cuidados de los conejos y trabajaron para preparar lo necesario.

A todos mis profesores que sembraron más que conocimientos y me guiaron para SER. Muchos de ellos además vieron en mí más que una alumna, gracias por reconocermme como individuo.

Especialmente agradezco al profesor José Antonio Martínez, a José Luis Tello, a Mario Chávez, a Checo, a Gumercindo de la Cruz, César René Pérez, porque además de las clases me transmitieron experiencias de vida que me permitieron crecer no sólo en lo profesional. Gracias por presionarme y por creer en mí. Con todo cariño.

A todos mis amigos, por presionarme, apoyarme y alentarme, no sólo en el iniciar y terminar este proyecto, sino en todo el trayecto que llevamos juntos.

Gracias a todos aquellos sin nombre que trabajan para las personas, que con su amabilidad pueden apoyarte y hacer una vida mejor.

DEDICATORIAS

A manera de agradecimiento, a todos mis compañeros de viaje, aquellos que recorrieron conmigo desde el inicio (o casi), aunque ya hayan tomado caminos separados. Sin sus miradas de familia, el trayecto hubiera sido más tortuoso. Gracias por todo su apoyo y las experiencias vividas.

A mis padres Isabel y Arturo por darme la oportunidad y las facilidades para estudiar, sin embargo, lejos de un apoyo material desde el inicio y aún ahora en la realización de esta tesis, con su amor único y peculiar me dieron la fuerza para SER y HACER. Cada uno a su manera supo cómo alentarme y ser inspiración. Cada uno sabe cómo sacarme una sonrisa y un pensamiento de "vale la pena" "ánimo", sin lo cual no hubiera podido. En este momento la palabra GRACIAS se vuelve infinita. Mamá, papá, este es sólo un pequeño regalo de admiración para ustedes.

Especialmente comparto mi admiración y agradecimiento a mi compañero de vida Paco, corazón, realmente sabes cómo hacer para dar en el punto clave para que aunque sea ruda la realidad, las cosas avancen o más bien, para moverlas yo misma. GRACIAS por soportarme en los momentos bajos y tensos de la ola y por reconocermelo y apreciar lo que soy y de lo que soy capaz.

A Mamá Chopi porque siempre ha sido un oído y un hombro, una sonrisa cálida y muuuy paciente. Gracias por darme tu amor, por escuchar con atención lo que te platicaba de la escuela, por quedarte conmigo hasta tarde y mandarme mi comida y por estar ahí siempre.

A mi hermana Magda porque compartimos vivencias que también forjaron lo que soy, me hicieron fuerte y sensible, gracias por creer en mí, por observar, por preocuparte por mí, por ser cómplice.

A mis amigos Mireya, Myriam, Alberto, Aarón, Erick Merchant. Gracias por todo su apoyo, por alentarme, escucharme, por las risas, las comidas juntos, por el aprendizaje, por ser. No puedo expresar en unas cuantas líneas el agradecimiento y la felicidad de que compartamos vidas. Sólo gracias.

A mi suegra Ángeles por todo su apoyo no material y material, por presionarme y también por creer en mí.

Especialmente quiero dedicar esto a todos mis alumnos que de alguna u otra forma me enseñaron a darme cuenta de muchas cosas sobre la ciencia, la biología y la vida.

Finalmente, dedico esto a los pequeños de la familia Leonardo, Gabriel y Santiago porque con sus sonrisas naturales y su mirada tierna quise ser una persona que en algún momento pueda inspirarlos a decir que sí se puede.

ÍNDICE

Abreviaturas	2
Resumen	3
Introducción	4
Síndrome Metabólico	4
Obesidad y depósito ectópico de lípidos	6
Inflamación	11
Moléculas relacionadas con la inflamación	13
TNF- α	13
IL-6	15
IL-10	18
Dieta e inflamación	20
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	24
Metodología	25
Resultados	29
Discusión	38
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Literatura citada.....	47

PRINCIPALES ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres	NFκB	Factor nuclear kappa B
AP	Ácido palmítico	OMS	Organización Mundial de la Salud
AMPK	Protein cinasa activada por mitógeno	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés
AKT	Serina/treonina cinasa	QPCR	Reacción en cadena de la polimerasa Cuantitativa, siglas en inglés
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2	RI	Resistencia a la insulina
ECV	Enfermedad cardiovascular	ROS	Especies reactivas de oxígeno, siglas en inglés.
EHNA	Esteato hepatitis no alcohólica	SM	Síndrome Metabólico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción, siglas en inglés
HGNA	Hígado graso no alcohólico	SOCS	Supresor de la señalización de citocinas, siglas en inglés
IG	Intolerancia a la glucosa	TA	Tejido adiposo
IL-6	Interleucina 6	TAB	Tejido adiposo blanco
IL-10	Interleucina 10	TG	Triglicéridos
IMC	Índice de masa corporal	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es considerado como un conjunto de factores que incrementan directamente el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular. De esta forma, es un importante reto de salud pública no sólo en México sino en todo el mundo debido a la industrialización, el exceso de ingesta energética, estilos de vida entre otros, relacionándose principalmente con la obesidad. La obesidad central se caracteriza por un aumento de la masa del tejido adiposo (TA) y su distribución en el cuerpo. Esta condición puede conducir al depósito ectópico de lípidos en tejidos no adiposos como el músculo, páncreas, corazón e hígado, siendo este último uno de los órganos más afectados, cuya respuesta inflamatoria involucra la producción de citocinas, encaminando el desarrollo y progresión del hígado graso no alcohólico. Actualmente, la relación entre la dieta y los biomarcadores de la inflamación está siendo un importante foco de estudio, ya que una dieta alta en grasas, especialmente las saturadas como el ácido palmítico (AP) puede promover la producción de moléculas inflamatorias desde etapas muy tempranas.

Debido a lo anterior se evaluó mediante PCR de tiempo real la expresión transcripcional de tres moléculas relacionadas con la inflamación: IL-6, IL-10 y TNF- α en hígado de conejo alimentados con una dieta enriquecida con 3% de ácido palmítico durante 6 y 12 meses. Se encontró que el AP induce una elevada producción de la molécula inflamatoria TNF- α a los 6 meses de tratamiento, lo cual puede sugerir una progresión en el daño hepático. A los 12 meses se registró una disminución en su expresión probablemente debido a la expresión de la molécula antiinflamatoria IL-10. Además de lo anterior encontramos que la IL-6 se expresa sólo a los 12 meses de tratamiento, pues su expresión podría depender de la cantidad y tiempo de exposición al estímulo (AP), pudiendo fungir como inmuno moduladora.

Este modelo buscó recrear lo que sucede bajo una ingesta crónica y elevada de ácidos grasos saturados y al medir la expresión transcripcional de los marcadores de la inflamación directamente en hígado nos da una idea muy temprana de este fenómeno, lo cual puede conducir la búsqueda de un sistema de diagnóstico temprano del hígado graso no alcohólico y del Síndrome Metabólico.

INTRODUCCIÓN

SÍNDROME METABÓLICO

El Síndrome Metabólico, anteriormente llamado Síndrome X por Reaven en 1988, ha causado controversia y falta de homogeneidad en su definición y desde entonces se ha buscado definir los criterios de diagnóstico más aceptados que evidencien la presencia o probabilidad de desarrollo de este síndrome, los cuales se presentan en la tabla 1, concentrando lo establecido por algunos grupos y organizaciones que son mayormente referidos en la literatura.

En la actualidad, de manera general se puede definir como un conjunto de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos que incrementan directamente el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedad cardiovascular (ECV) (Aschner, P., 2010; Kaur, J., 2014; Thaman and Arora, 2013). Este síndrome ha sido propuesto y utilizado como una herramienta útil para estimar el riesgo de que una cierta población desarrolle dichas enfermedades (Aschner, P., 2010; Murguía-Romero *et al.*, 2015).

El síndrome metabólico (SM) es un importante y creciente reto de salud pública no sólo en México sino en todo el mundo debido a la urbanización, el exceso de ingesta energética y los estilos de vida, entre otros.

La prevalencia mundial de este síndrome varía entre el 10 y el 84% de la población según diversos factores como la región urbana o rural, el género, la edad, la raza, la condición socioeconómica, una vida sedentaria, fumar, una historia familiar de diabetes, así como los valores clínicos de acuerdo a la definición de SM utilizada. Así bien, la FID (Federación Internacional de Diabetes) estima que un cuarto de la población adulta mundial presenta síndrome metabólico (IDF, 2006). En cuanto a México, se estima que en la población adulta (20 a 69 años) hay más de 17 millones de hipertensos, más de 14 millones de dislipidémicos, más de 6 millones de diabéticos, y más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad (García, G. E. *et al.*, 2008).

En cuanto a su aplicación en la clínica, las alteraciones metabólicas en el SM se registran de manera simultánea y entre más concurrencia de factores haya, mayor es el riesgo de ECV en comparación con el riesgo debido a una sola condición (Huang, P. L., 2009; Kaur, J., 2014). En los últimos años se han llevado a cabo numerosas revisiones en donde se cuestionan la definición misma del SM y su utilidad, por ejemplo Alberti y Zimmet (2008) consideran que el entendimiento de su definición sirve para identificar los estados de riesgo como la pre-diabetes y la dislipidemia, por lo que es importante conocer su alcance.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico y definición del Síndrome Metabólico.

Medición clínica	OMS	NCEP/ATP III	FID
Resistencia a la insulina	DM2, IG, AGA, menor sensibilidad a la insulina. Más dos de los siguientes:	Ninguno, pero se debe contar con 3 de las siguientes características:	Ninguno, pero se debe de contar con 2 de las siguientes características:
Glucosa	IG, AGA, DM2	≥110 mg/dL (incluye diabetes)	≥110 mg/dL (incluye diabetes)*
Peso corporal u obesidad central	IMC > 30 kg/m ² y/o Relación cintura-cadera >0.9 (hombres), >0.85 (mujeres)	Circunferencia de cintura ≥ 102 cm (hombres) ≥ 88 cm (mujeres)	≥ 94 cm (hombres) ≥ 88 cm (mujeres). Varía por población específica.
Lípidos	TG ≥150mg/dL y/o Colesterol HDL < 35 mg/dL (hombres), <39 mg/dL (mujeres)	TG ≥150mg/dL Colesterol HDL < 40 mg/dL (hombres), <50 mg/dL (mujeres)	TG ≥150mg/dL Colesterol HDL < 40 mg/dL (hombres), <50 mg/dL (mujeres) o estar bajo tratamiento.
Presión arterial	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130 mmHg sistólica o ≥ 85 mmHg diastólica o estar bajo tratamiento.
Otros	Microalbuminuria >20µg/min o Proporción albúmina:creatinina >30mg/g	No	No

Nomenclatura: OMS: Organización Mundial de la Salud; NCEP/ATP III: Programa Nacional de Educación en Colesterol/Panel de tratamiento de adultos (siglas en inglés); FID: Federación Internacional de Diabetes
DM2: diabetes mellitus tipo 2; IG: intolerancia a la glucosa; AGA: alteración de la glucosa en ayuno, IMC: índice de masa corporal; TG: triglicéridos; * Según Kaur J. (2014), la Asociación Americana de Diabetes cambió en 2003 el criterio a >100 mg/dL.

Fuente: Adaptado y compendiado de García, G. E. *et al.*, 2008; Grundy *et al.*, 2005; Huang, P. L., 2009; Kaur J., 2014; Thaman y Arora, 2013; Alberti, 1998.

Un síndrome es definido como el conjunto de características clínicas específicas, sin embargo, los intentos por definir al síndrome metabólico como una entidad clínica han sido fallidos a falta de un criterio unificador (Thaman y Arora, 2013), por lo que es preciso estudiar y describir al SM como consecuencia de la compleja interrelación de sus factores fisiopatológicos (Kaur, 2014) para poder así identificar a las personas en riesgo de ECV e intervenir tempranamente en su prevención.

En diversos estudios (Das *et al.*, 2011; Grundy, 2008; Kaur, 2014; Thaman y Arora, 2013) ha sido ampliamente reconocido que en el síndrome metabólico interaccionan factores genéticos y ambientales tales como la obesidad central, dislipidemia, disfunción endotelial, hipertensión, estado protrombótico e inflamatorio y la resistencia a la insulina, siendo el último el mediador primario (García *et al.*, 2008; Thaman y Arora, 2013).

Sumado a lo anterior, la FID (2006) agrega otros criterios como factores hormonales como el eje pituitario-adrenal y la distribución anormal de grasa en el cuerpo, que al igual que Das y Balakrishnan (2011) que señalan al depósito de lípidos y al hígado graso no alcohólico (HGNA) como componentes de este síndrome. Por su parte, Alberti y colaboradores (2009) mencionan entre los componentes presión sanguínea y triglicéridos elevados, baja concentración de colesterol HDL y particularmente adiposidad central. Kaur (2014) define al SM como un estado de inflamación de bajo grado ya que este fenómeno aparece en la mayoría de los factores involucrados tales como el depósito ectópico de lípidos, y la resistencia a la insulina.

OBESIDAD Y DEPÓSITO ECTÓPICO DE LÍPIDOS

En la actualidad, se ha incrementado la prevalencia del sobre peso y la obesidad a nivel mundial y son considerados epidemia (Dhurandhar, 2014; Grundy, 2008; Kaur 2014; Murguía-Romero *et al.*, 2015). La OMS en su nota descriptiva número 311 (2015) reporta que el 39% de la población adulta tiene sobre peso y el 13% obesidad. México no es la excepción, pues según García y colaboradores (2008) la obesidad es el

principal problema de salud pública al que debemos de enfrentarnos dadas sus consecuencias y asociación con las principales causas de mortalidad.

Para el desarrollo de la obesidad participan factores nutricionales-ambientales y genéticos (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005) y como Kaur (2014) comenta, es impulsada por el creciente consumo de comida “barata y altamente calórica”, asociada con factores socioculturales, y estilos de vida con una reducida actividad física, además de anormalidades endócrino metabólicas, resultando en una estrecha relación con padecimientos como la RI, DM2, dislipidemia, HGNA, ECV (Mancini *et al.*, 2015) y como ya se ha venido mencionando, con el síndrome metabólico.

La obesidad está caracterizada por un aumento en la masa del tejido adiposo y su distribución en el cuerpo. Partiendo de este hecho, se clasifica a la obesidad en ginoide y androide, en donde la primera corresponde a la acumulación de grasa en la parte baja del cuerpo y que pareciera no estar asociada con consecuencias metabólicas mayores, mientras que la segunda es una obesidad central, es decir en el tórax y en el abdomen que resulta en el riesgo aumentado de diabetes y arterioesclerosis, dislipidemia, hipertensión, y entre otros enfermedades hepáticas como hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatosis hepática (Calder, *et al.*, 2011). De esta manera, en lo últimos años se ha hecho énfasis en el estudio de la obesidad y la distribución de grasa en el cuerpo (Zamboni *et al.*, 2014), que es determinante en la homeostasis metabólica ya que en condiciones naturales los lípidos, principalmente los triglicéridos, son almacenados en los adipocitos, células del tejido adiposo (Lui *et al.*, 2014, Bradbury, 2006).

El tejido adiposo se divide en tejido adiposo pardo, encargado de la termogénesis y el tejido adiposo blanco (TAB) que es el encargado del almacenamiento de la grasa y fungir como órgano secretor (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2005), además, participa en la regulación metabólica como la ingesta, el gasto energético y la sensibilidad insulínica, así como en el crecimiento celular y la respuesta inmunológica, por lo que ahora se reconoce que posee funciones endócrinas y parácrinas (Sánchez N. *et al.*, 2010). Así, el tejido adiposo no sólo está formado por los adipocitos que van del 60 al 70% de la estructura del tejido (García-Torres *et al.*, 2011), sino que es una mezcla heterogénea

de adipocitos, pre adipocitos, células endoteliales e inmunitarias que responde dinámicamente ante las variaciones.

Trabajos recientes han demostrado que la sobrealimentación y dieta alta en grasas modifica la masa del TAB. En respuesta a ello (ver figura 1), el tejido adiposo altera su fisiología normal favoreciendo que los adipocitos excedan su capacidad de almacenamiento, lo que causa hipertrofia e hiperplasia. Además, atendiendo a su función secretora produce adipocitocinas del estado inflamatorio (Kaur, 2013) que conducirá al depósito ectópico de lípidos en tejidos como el hígado, músculo, páncreas (Lettner y Roden, 2008) y corazón (Lui *et al.*, 2014) (Unger *et al.*, 2010).

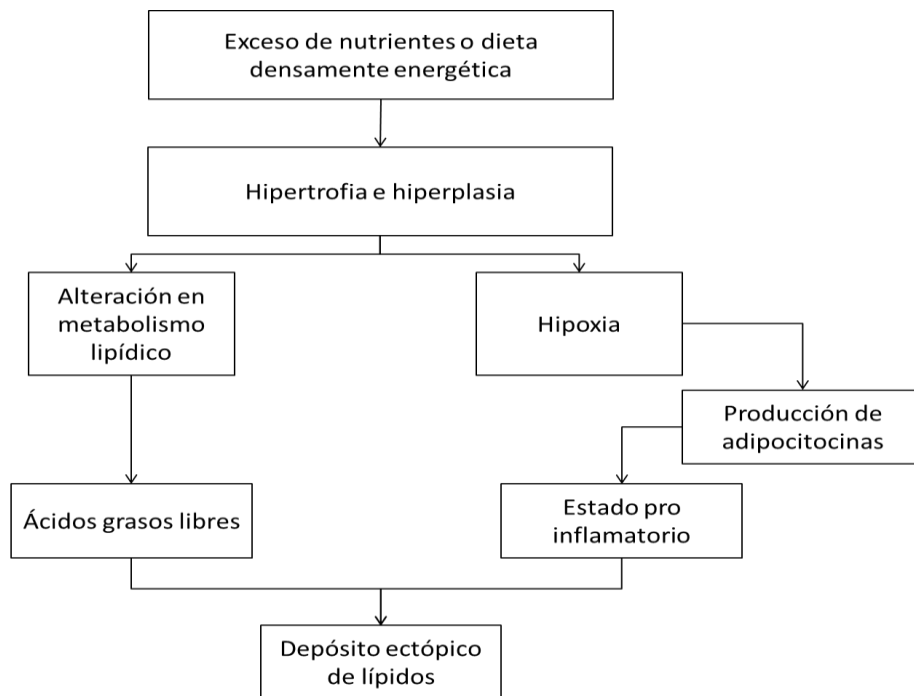


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta del tejido adiposo al exceso de nutrientes o a la dieta densamente energética.

Como se ha descrito, se hace énfasis no solo en el estudio de la obesidad sino también en la distribución corporal de la grasa. En este sentido cabe recordar que el tejido adiposo visceral secreta productos que se dirigen hacia el hígado mediante la circulación portal, lo cual resulta en el ingreso de ácidos grasos libres al hígado. Así,

dicho órgano es uno de los más afectados en la deposición ectópica de lípidos, desencadenando así patologías como el hígado graso no alcohólico (Das y Balakrishnan, 2011).

El Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) es considerado como la manifestación hepática del Síndrome Metabólico (Das y Balakrishnan, 2011; Cruz *et al.*, 2014) ya que está relacionado con insulinoresistencia hepática, hiperinsulinemia, dislipidemia e hiperglucemia (García-Torres *et al.*, 2011). En la actualidad este padecimiento es una de las enfermedades del hígado más comunes afectando entre el 20 y el 30% de la población adulta en países desarrollados y a un 80% de las personas con obesidad.

En términos generales esta condición se puede definir como la acumulación excesiva de grasa en los hepatocitos, en el que al menos el 5% de dichas células presentan gotas lipídicas que en suma exceden del 5 al 10% el peso normal del hígado respecto a personas sanas que no consumen cantidades significativas de alcohol y que puede dar paso a un deterioro crónico hepático (Zahran *et al.*, 2013, Cruz *et al.*, 2014). La fisiología de la enfermedad puede ir desde una esteatosis, es decir, una acumulación anormal de grasa principalmente como triglicéridos o hasta una progresión inflamatoria llamada esteato hepatitis, debido a la peroxidación de lípidos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés). Finalmente, puede desencadenar en fibrosis, cirrosis, y cáncer (Tilg y Moschen, 2010).

Los triglicéridos son la principal forma de lípidos que se almacenan en el hígado y son varios los mecanismos de depósito (Figura 2) que conducen a esteatosis o hígado graso. Cabe recordar que el hígado es el mayor regulador del flujo metabólico en el cuerpo; recibe información del intestino, la circulación general y el sistema linfático para que los hepatocitos remuevan materiales y los liberen en productos en un rango moderado. De esta forma, la capacidad de captura de sustancias, en este caso de lípidos, es la clave del inicio de la esteatosis (Bradbury, 2006) ya que el ingreso de AGL provenientes de la dieta o de la lipólisis del tejido adiposo constituye tres cuartas partes de los lípidos acumulados (Tilg y Moschen, 2010).

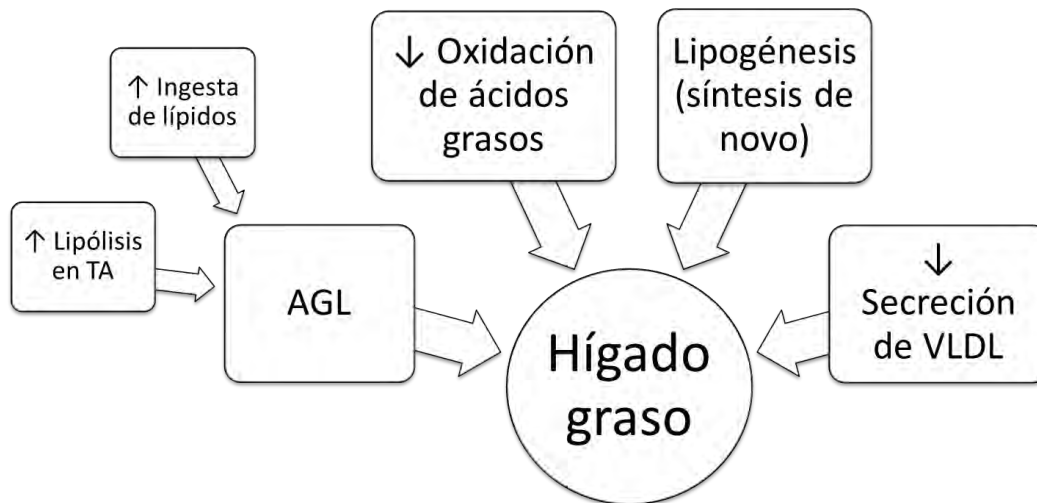


Figura 2. Mecanismos de almacenamiento de lípidos en el hígado.

Abreviaturas: TA: tejido adiposo, AGL: ácidos grasos libres, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (siglas en inglés).

La esteatosis está comúnmente asociada con la resistencia a la insulina y se ha incrementado la evidencia que la progresión hacia esteato hepatitis no alcohólica (EHNA) puede continuar teniendo como causa la persistencia del origen de la reserva de grasa, así como la conjunción de otros factores, como la susceptibilidad a especies reactivas de oxígeno, endotoxinas provenientes de hígado y citocinas. Dichas especies reactivas de oxígeno (ROS) son resultantes de la activación de sistemas de oxidación como respuesta a la sobrecarga de los hepatocitos, fenómeno que podría estimular a las células que participan en la fibrogénesis y apoptosis, así como una respuesta inflamatoria, conduciendo a un daño mayor de la EHNA (Reddy y Rao, 2006).

INFLAMACIÓN

Para dilucidar varias afecciones, incluyendo el síndrome metabólico es necesario comprender los procesos metabólicos locales y/o sistémicos involucrados, teniendo como característica a resaltar el fenómeno inflamatorio.

La inflamación, componente central de la inmunidad innata y adaptativa, es un mecanismo normal de defensa que protege ante las infecciones que además ayuda a reparar tejidos y restablecer la homeostasis en los sitios dañados o infectados (Calder, P. *et.al*, 2011). Esta respuesta del involucra un incremento en el flujo sanguíneo, dilatación capilar, infiltración leucocitaria y la producción de mediadores químicos (Minihane *et. al*, 2015), algunos de los cuales inician la regulación de la misma inflamación. De esta forma, la inflamación es un proceso normal cuyos elementos son regulados apropiadamente, con retroalimentación negativa que es esencial en el mantenimiento de la salud. Cuando los mecanismos reguladores se alteran pueden ocasionar daños en el tejido, así como enfermedades caracterizadas por la permanencia de los marcadores de la inflamación en el sitio y en la circulación sistémica.

Calder y colaboradores (*ídem*) mencionan que la inflamación, que es crónica y de bajo grado, ha recibido un amplio interés en los últimos años, y manejan su concepto no como característica, sino como un factor de riesgo para el progreso de varios padecimientos. La idea de la inflamación como partícipe del inicio de las enfermedades, está basada en la observación de un incremento de los marcadores asociados con la inflamación en personas con dichas afectaciones aún antes del desarrollo de las mismas (Koup y Mandrup-Poulsen, 2010, Fernández y Pickup, 2008).

Así mismo, Minihane y cols. (*ídem*) describen que es posible que la respuesta inflamatoria esté involucrada desde etapas tempranas en el desarrollo de la enfermedad, pues no solamente juegan un papel directo en la afectación local sino que también son determinantes en la disfunción de varios órganos (Harford *et al.*,2011).

En el tejido adiposo, el fenómeno inflamatorio puede actuar como “no dañino” o como “dañino”. Al denominarlo como no dañino puede ser entendido como un mecanismo de sobrevivencia y adaptación metabólica, mientras que ser perjudicial corresponde a la inflamación crónica de bajo grado, característica patológica de una variada serie de condiciones tales como el Síndrome Metabólico, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y como ya se ha comentado, en el HGNA (Hotamisligil, 2006, Minihane *et. al*, 2015) ya que durante el proceso inflamatorio se inhibe la diferenciación de preadipocitos y se altera el metabolismo de los lípidos ocasionando su acumulación en hígado y en otros tejidos no adiposos (Liu, et al., 2014).

Por su parte, Emanuela y colaboradores (2012) y Sánchez- Muñoz, *et al.* (2005) relacionan el aumento del tejido adiposo abdominal con la producción crónica de mediadores de la inflamación así como con la activación de vías de señalización correspondientes siendo el hígado uno de los órganos más afectados.

Es necesario mencionar que esta inflamación de bajo grado es característica de la obesidad en comparación con personas delgadas (Calder, P. *et al.*, 2011), sin embargo Minihane y colaboradores (*ídem*) reportan que existe hasta un 30% de obesos, considerados metabólicamente sanos que presentan expresión de mediadores inflamatorios de dos a cuatro veces menor que el resto de los obesos y por tanto el riesgo de desarrollar SM es considerablemente más bajo. Así también, Kaur en 2014 indica que a pesar de que la inflamación es característica del estado obeso, algunos individuos con normo peso pueden presentar moléculas inflamatorias, probablemente debido a principios genéticos o a una distribución alterada del tejido adiposo.

Moléculas relacionadas con la inflamación

Como ya se ha mencionado, la hipertrofia de los tejidos está asociada con la inflamación. En respuesta al estímulo ocurre una infiltración de células inmunitarias, en especial macrófagos y células T, que median cambios metabólicos, conocidos como reacciones de fase aguda, ya que liberan moléculas específicas, creando así un ambiente de inflamación (Weisberg *et al.*, 2003, Khalil *et al.*, 2012).

Existen numerosos mediadores ligados a este proceso inflamatorio de bajo grado en el tejido adiposo y en sangre, incluyendo leucocitos, moléculas de adhesión, adipocinas, proteínas y mediadores solubles como quimiocinas y citocinas. Algunos de estos mediadores pueden ser considerados “biomarcadores” ya que reflejan que está ocurriendo un fenómeno inflamatorio y son predictivas del estado futuro de salud, sin embargo son de naturalezas químicas tan diversas como su función tejido-específica, lo cual dificulta el consenso respecto a los que serían los mejores biomarcadores (Minihane *et al.*, 2015).

Dentro de las moléculas mencionados están las citocinas de cuyo grupo podemos destacar a IL-6 y TNF- α , las cuales han sido relacionadas con alteraciones en la cascada de señalización de la insulina y un trastorno en el metabolismo de los lípidos, induciendo así RI, DM2 y SM (Minihane *et al.*, 2015, Weisberg *et al.*, 2003, Fernández y Pickup, 2008) y la liberación de ácidos grasos que son depositados en otros órganos (Liu, *et al.*, 2014). Además, en la contraparte, se producen moléculas antiinflamatorias como la interleucina (IL-10), probablemente producida como respuesta al fenómeno en cuestión.

TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en inglés), es uno de los más importantes mediadores en el proceso inflamatorio. En el ser humano el gen de esta citocina tiene una localización 6p21.3, se encuentra en la cadena de sentido positivo y

tiene un tamaño total de 2770 pb. El mRNA tiene una longitud de 1686 pb y presenta un total de 3 exones y 4 intrones. En el caso de *Oryctolagus cuniculus*, el gen de TNF- α se encuentra en el cromosoma 12 y tiene una longitud de 1560 pb, mientras que el mRNA tiene una longitud de 1671 pb y cuenta con un total de 4 exones (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La regulación transcripcional de este gen se ha relacionado con múltiples factores de transcripción como: NF κ B, AP-1 y Egr-1 (Kishore *et al.*, 2004).

La secreción principal de TNF- α corresponde a los macrófagos (M1) y linfocitos, aunque puede ser también liberada por los adipocitos. Así, TNF- α es una molécula que se encuentra aumentada en la obesidad y, además de asociarse con la resistencia a la insulina, está involucrada en el desarrollo de varios padecimientos asociados con el peso elevado o con la acumulación ectópica de grasa como el HGA (Khalil *et al.*, 2012), siendo esta citocina correlacionada positivamente con la progresión de dicha enfermedad (Zahran, 2013).

Según Calder *et al.* (2011) la relación entre obesidad y la inflamación de bajo grado fue propuesta por primera vez por Hotamisligil y colaboradores 1993, en donde describen que el tejido adiposo blanco produce y libera la citocina pro inflamatoria TNF- α , siendo ésta elevada en organismos obesos insulino resistentes tanto humanos como roedores. De esta forma, se sugirió la idea de que el tejido adiposo blanco juega un importante papel en el desarrollo de la inflamación crónica como disfunción metabólica asociada con la obesidad.

Dentro de las numerosas alteraciones ocasionadas por el factor de necrosis tumoral alfa se ha reportado que impide la diferenciación de los pre adipocitos, bloquea la absorción y almacenamiento de los ácidos grasos al disminuir la expresión y actividad de la lipoproteína lipasa, además de que es capaz de disminuir la actividad de la tirosin cinasa de los receptores de insulina y de la lipoproteína cinasa, y de estimular la lipólisis en adipocitos (Li L, 2007, Khalil, 2012).

Asimismo, Sánchez y colaboradores en el 2010 reportan que TNF es responsable de aumentar la producción de resistina en leucocitos de sangre periférica y de promover la infiltración de células inflamatorias en el tejido adiposo, constituyéndose como un factor de riesgo de arterioesclerosis ya que aumenta la expresión de factores que ocasionan el depósito de placa. Aunado a esto, es partícipe de la disfunción endotelial encontrada en sujetos con hipertensión.

La molécula pro inflamatoria TNF- α es un foco de interés ya que no sólo figura alteraciones metabólicas por sí misma, sino que también puede acelerar la síntesis de otras citocinas como la IL-6, desencadenando una respuesta inflamatoria más severa. Además de estar relacionado con la liberación de IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa induce la producción de leptina; así, ambas moléculas estimulan a la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Figura 3), lo cual es benéfico en las reacciones inmunitarias, mientras que de manera prolongada o en ausencia de infección causa daño en los tejidos (Hauner, H., 2005).

IL-6

La interleucina 6 es una citocina relacionada con la inflamación, con algunos efectos pleiotrópicos. En el ser humano la localización de su gen es 7p21, se encuentra en la cadena de sentido positivo y tiene un tamaño total de 6561 pb, el mRNA tiene una longitud de 1197 nts, y cuenta con un total de 4 exones y 4 intrones (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En el caso de *Oryctolagus cuniculus*, el gen correspondiente se encuentra en el cromosoma 10, su mRNA corresponde a 1132 pb y cuenta con un total de 5 exones (*ibídem*). La región promotora tiene una extensión de 1.2 kb río arriba y contiene todos los elementos necesarios para la regulación transcripcional, incluyendo sitios para la unión de factores de transcripción como AP1, C/EBP y NF κ B (Wongchana y Palaga, 2012).

La IL-6 es una citocina pro inflamatoria liberada principalmente por el tejido adiposo, en su mayoría por el visceral, lo cual apoya la idea de la obesidad abdominal como factor de riesgo para el desarrollo del SM. Bajo este esquema, se han reportado niveles

elevados de esta citocina junto con TNF- α y otras interleucinas en sujetos obesos resistentes a la insulina; trabajos similares demuestran que al igual que TNF, estimula la progresión del hígado graso no alcohólico (Sánchez, *et al.*, 2010).

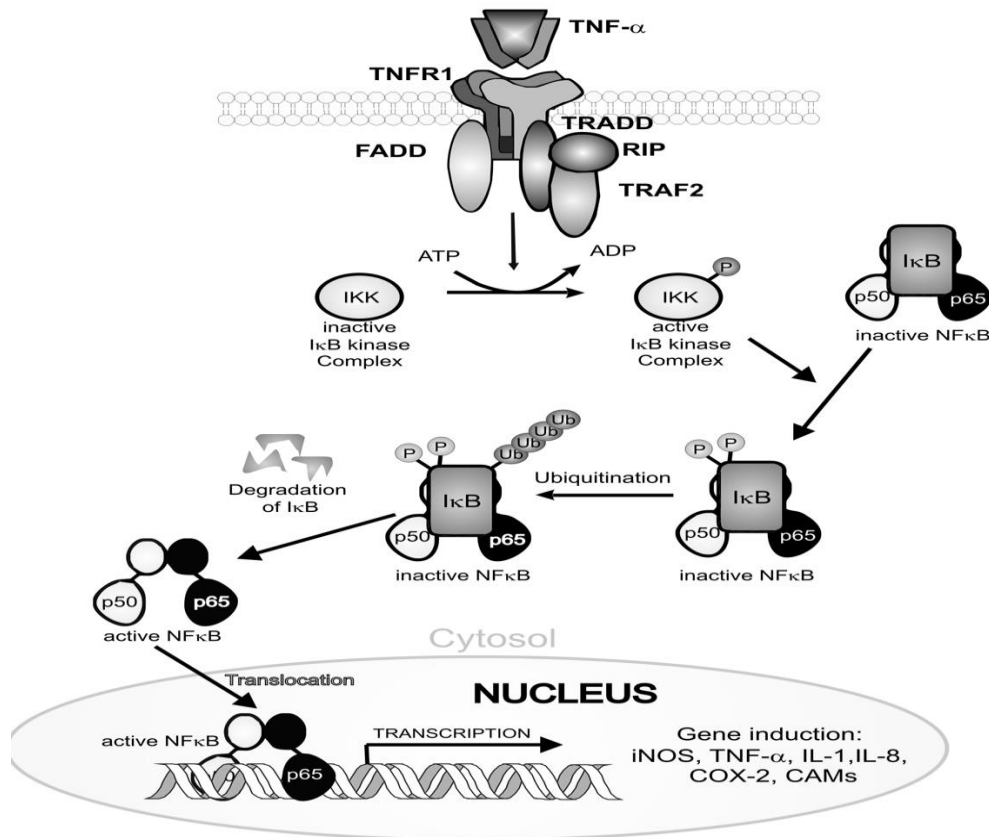


Figura 3. Esquemización del mecanismo de activación de NFκB debido a TNF- α . Se observa que debido a la unión de TNF- α a su receptor se activa la cascada de señalización que resulta en la activación de NFκB y su translocación hacia el núcleo, lo cual induce la expresión de otros genes inflamatorios. Tomado de Ingaramo *et al.*, 2013

Además, IL-6 está relacionada con la cantidad de grasa visceral, el tamaño del adipocito y la alteración en su diferenciación, pudiendo contribuir al desarrollo de arterioesclerosis e hipertrigliceridemia debido al depósito de placa que ocasiona así como por estimular la lipólisis y secreción hepática de triglicéridos (Vonghia, 2015, Calder, 2011).

Asimismo, la IL-6 y TNF- α se han correlacionado negativamente con la expresión de al menos dos moléculas: adiponectina que participa en la oxidación de ácidos grasos, y con la interleucina 10 que posee actividad antiinflamatoria y tiene una relación contraria a las primeras (Khalil, 2012).

Como se ha venido mencionando, la interleucina 6 juega un papel crítico en la respuesta local y sistémica de la inflamación; sin embargo, participa también en el desarrollo de respuestas celulares e inmunes específicas, incluyendo la diferenciación de las células B y la activación de las células T, así como el reclutamiento de leucocitos y monocitos al sitio de inflamación, por lo que es importante en la transición de la inflamación aguda a la crónica (Khalil, 2012, Scheller, 2011). Respecto a esto, Neurath y Finotto en el 2011 reportan que la señalización de IL-6 juega un papel esencial en el control y diferenciación de los linfocitos T induciendo las vías Jak/STAT-3 y Ras/Erk/C/EBP. En su estudio enfatizan que particularmente esta interleucina modula la resistencia de las células T a la apoptosis, induce la activación de las células Th (T helper, por sus siglas en inglés) y genera un balance entre ambas (T y Th).

Habitualmente se había considerado a la IL-6 sólo como una molécula pro inflamatoria, sin embargo, de manera superflua se ha reconocido que esta molécula participa en la regulación del metabolismo, así como en algunos procesos regenerativos, por lo que se puede decir que es inmuno moduladora, dependiendo del tejido, así como del estímulo y tiempo de exposición a éste (Scheller *et al.*, 2011).

El mecanismo por el cual esta citocina es capaz de actuar está siendo un blanco para posibles intervenciones terapéutica. De manera general se puede mencionar que ya sea que se active la vía clásica o la trans señalización (Scheller *et al.*, 2011), gracias al estímulo de NF κ B, la IL-6 se une a su receptor y se moviliza una cascada que activa MAPK, AKT y STAT así como su *feedback* inhibitorio SOCS (figura 4) (Mihara, *et al.*, 2012, Costa-Pereira, 2014), lo cual hace referencia a sus funciones inmuno moduladoras.

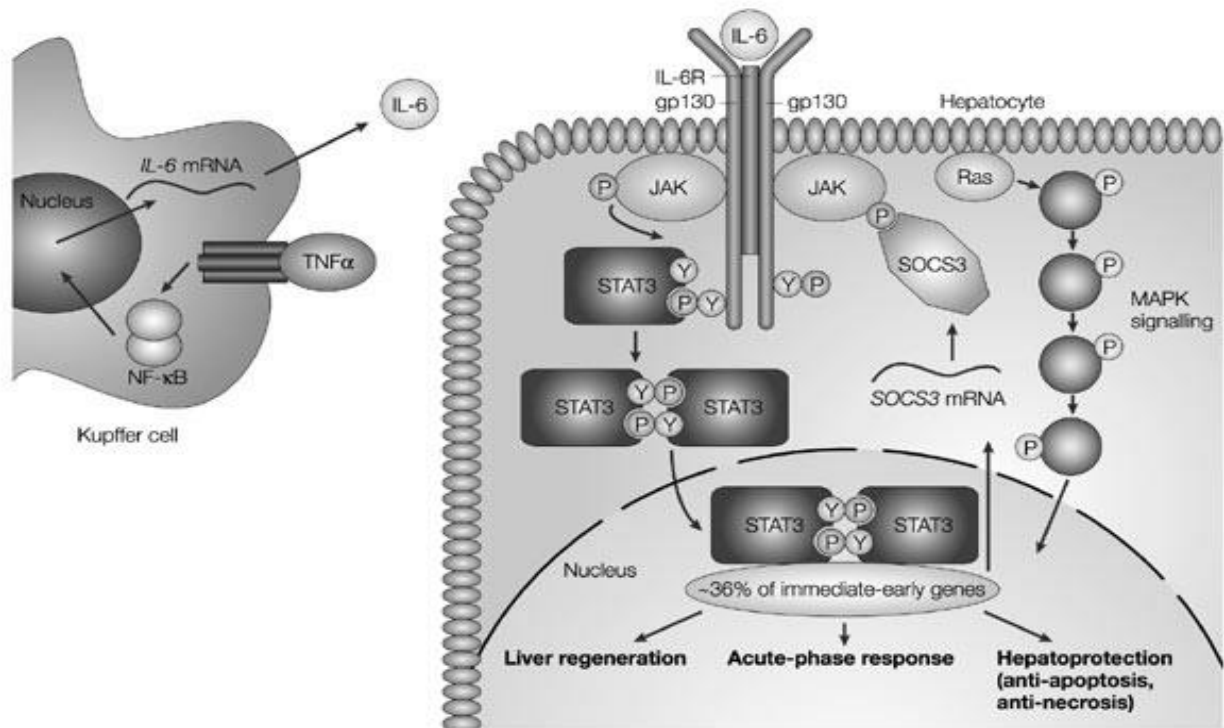


Figura 4. Cascada de señalización de la IL-6. Gracias al estímulo de NF κ B, debido a la expresión de TNF α , se produce IL6 y gracias a la unión con su receptor se desencadena la cascada de señalización, ya sea vía MAPK o STAT, con su retroalimentación negativa SOCS3. Tomado de: Taub, 2004.

IL-10

La interleucina 10 es una citocina con propiedades anti inflamatorias ya que tiene efectos moduladores en la respuesta inmunológica. En el ser humano, la localización de su gen es 1q32, se encuentra en la cadena de sentido negativo, y tiene una longitud total de 4892 pb. El mRNA tiene una extensión 1629 pb y cuenta con 5 exones 6 intrones. En el caso de *Oryctolagus cuniculus*, el gen de IL-10 se encuentra en el cromosoma 16 y tiene una extensión de 6427 pb. El mRNA tiene 1227 pb de longitud, con un total de 6 exones (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La regulación transcripcional de este gen se a relacionado con múltiples factores de transcripción como: E4BP4, MAF, STAT4, GATA3, Jun, e IRF4 (Kubo *et al.*, 2012).

Desde la década de los noventa Waal, Abrams y colaboradores demostraron la habilidad de los monocitos activados por lipopolisacáridos (LPS) de secretar IL-10 de manera similar a la liberación de moléculas pro inflamatorias. En adición, se ha encontrado a la IL-10 como responsable de la reducción de la expresión de algunos complejos y receptores debido a la activación de los monocitos con LPS. De esta forma, la interleucina 10 no solamente posee capacidad auto reguladora sino que también tiene importantes efectos moderadores en las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Así bien, se ha demostrado que la severidad de la esteatosis está relacionada con la deficiencia en la producción de IL-10 y con el incremento de colesterol de alta densidad HDL-c (Khalil, 2012).

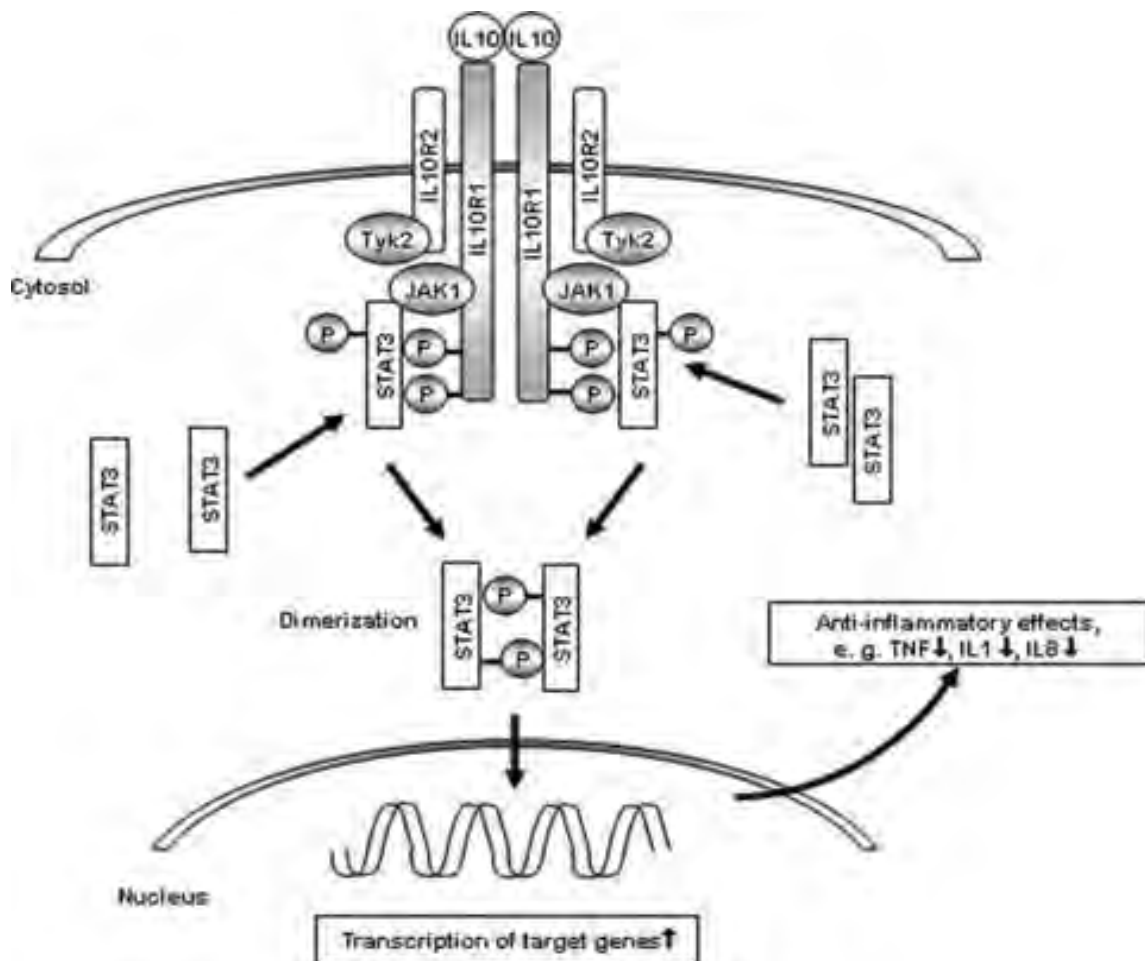


Figura 5. Cascada de señalización de la IL10, tomado de Glocker *et al.*, 2011. Gracias a la activación de JAK/STAT 3 inducida por IL-10, resulta en una disminución de la expresión de moléculas inflamatorias como TNF- α .

Por otra parte, bajo ciertos tratamientos, como la pérdida de peso, o antiinflamatorios específicos se ha observado el aumento de factores antiinflamatorios como la Interleucina 10 (Calder et al 2011).

Como se ha venido mencionado, la IL-10 es un importante inmuno modulador con efectos anti inflamatorios, y su vía de acción comienza con la unión de la molécula al dominio extracelular, ocasionando la fosforilación de JAK 1 y resultando en la activación de STAT 3, lo que resulta en una disminución de la expresión de moléculas inflamatorias como TNF- α . STAT 3 también promueve la transcripción del Supresor de señalización de citocinas (SOCS 3) que actúa como una retroalimentación negativa e inhibe la expresión de citocinas inflamatorias (figura 5) (Hu *et al.*, 2007).

DIETA E INFLAMACIÓN

El sobrepeso y la obesidad, son resultado del desbalance entre la energía ingerida y la energía gastada. Así los desórdenes relacionados como el HGNA, la hipertensión, entre otros, así como el desarrollo del Síndrome Metabólico son consecuencia del actual estilo de vida y resultado del consumo de dietas “inflamatorias” elevadas en grasa y carbohidratos (Tilg y Moschen, 2010).

En la actualidad hay varios estudios relacionados con el análisis de los patrones alimenticios y los biomarcadores de la inflamación (Barbaresko, 2013, Minihane *et. al*, 2015, Galland, 2010, Calder, P. *et. al*, 2011), a partir de los cuales se observa que el inicio de la inflamación, y su mantenimiento están estrechamente relacionados con el consumo de dietas ricas en carnes rojas, lácteos, harinas refinadas y aceites (Hu, 2002) generando un aumento en ciertas moléculas pro inflamatorias. Por otro lado, los patrones de dieta saludable están relacionados con menores concentraciones de marcadores de la inflamación (Calder, P. *et. al*, 2011) en comparación con aquellos con dietas altas en grasas y/o carbohidratos. Además, según Hu, F.B. en el 2002, dichos patrones pueden incluir interacciones entre los nutrientes, así como la ingesta específica del mismo nutriente a partir de distintas fuentes alimenticias.

Entre los tipos de sustancias más abundantes en las dietas actuales y que son de sumo interés se encuentran los ácidos grasos; dentro los cuales, los ácidos grasos saturados promueven la inflamación, mientras que los insaturados son antiinflamatorios (Calder, 2011).

El ácido palmítico (AP) es un ácido graso saturado de 16 carbonos, presente en el refinado del aceite de palma, ampliamente usado en la industria alimenticia ya que es el más barato de los aceites comestibles (Mancini et al, 2015).

Dada la industrialización y los cambios de vida en los últimos años, el uso del AP se ha incrementado enormemente, hasta llegar a ser el lípido más abundante en la dieta humana. Mientras tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS 2003) recomienda que el consumo de AP debiera ser menor al 10%.

El consumo de AP ha sido ligado al desarrollo de algunas enfermedades, por ejemplo, existen algunos estudios que sugieren de manera muy general la relación con la obesidad y el avance de DM2 (Mancini et al, 2015). Asimismo, otras investigaciones relacionan el efecto del ácido palmítico con enfermedades cardiovasculares y carcinogénesis (Fattore y Fanelli, 2013). Además, se ha observado que el AP en altas dosis promueve la inflamación y la producción de especies reactivas de oxígeno causando estrés oxidativo (Odia, *et al.*, 2015). Los estudios sobre la dieta, sus componentes y su relación con la inflamación no son exhaustivos (Calder, P. *et al.*, 2011), además de que los efectos del consumo de dietas moderadas en AP y bajo una administración crónica no han sido ampliamente estudiados.

JUSTIFICACIÓN

Es preciso enfatizar que el sobrepeso y la obesidad van en aumento no sólo en México sino a nivel mundial y son el resultado de un desbalance entre la energía ingerida y la gastada como consecuencia de los actuales estilos de vida. Además, estas condiciones incrementan la posibilidad de desarrollar importantes complicaciones a la salud como el Síndrome Metabólico y otros desórdenes relacionados como el hígado graso.

Así bien, un mayor conocimiento de estas patologías puede conducir a la investigación de sus primeras causas y permitir un preciso acercamiento farmacológico y cambios en el estilo de vida para detener su progresión.

Numerosos estudios han conducido al esclarecimiento de la fisiología del tejido adiposo y su participación en el desarrollo del SM en relación con la producción y secreción de diversas proteínas, con la comunicación cruzada con otros órganos para la deposición ectópica de lípidos y con un fenómeno inflamatorio. Dicha inflamación es característica no sólo del SM y también de algunas de sus patologías en los órganos mayormente afectados como el hígado.

Es posible que la respuesta inflamatoria esté involucrada desde etapas tempranas en el desarrollo de la enfermedad esteatosis no alcohólica en el hígado, misma que puede ser consecuencia del consumo de dietas “inflamatorias” elevadas en grasas saturadas. Como ya se ha mencionado anteriormente, uno de estos lípidos es el ácido palmítico, un ácido graso saturado muy abundante en la dieta debido al proceso de industrialización de los alimentos. Sin embargo los estudios sobre la dieta, sus componentes y su asociación con la inflamación no son exhaustivos, además de que los efectos del consumo de dietas moderadas en AP y bajo una administración crónica aún no han sido ampliamente estudiados en relación con la aparición temprana de la inflamación en hígado.

HIPÓTESIS

El consumo moderado de ácido palmítico en la dieta induce el inicio de un fenómeno inflamatorio en el hígado, evidenciado por la expresión de moléculas inflamatorias, mismo que puede ser mediado con otras moléculas con efecto contrario. Además, la expresión de dichas moléculas puede variar según el tiempo de exposición al AP.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la concentración del mensajero de IL-6, IL-10 y TNF- α en hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) alimentados con una dieta enriquecida con 3% de ácido palmítico.

Objetivos particulares:

- Analizar mediante Q-rtPCR (tiempo real) la expresión del RNAm de IL-6, IL-10 y TNF- α en hígados de conejo tratados durante 6 y 12 meses con una dieta enriquecida en ácido palmítico.
- Comparar la expresión del RNAm de IL-6, IL10 y TNF- α entre los animales tratados y no tratados.
- Comparar la expresión del RNAm de IL-6, IL10 y TNF- α a los distintos tiempos.

METODOLOGÍA

Grupos experimentales y tratamientos

Se utilizaron hígados de 12 conejos macho de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* NZW) adquiridos en la granja de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Dichos organismos fueron tratados y mantenidos previamente como se describe a continuación.

Los conejos seleccionados contaban con 30 días de nacidos y 300 ± 30 gr de peso y se mantuvieron a 23 ± 5 °C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz en el bioterio de F.E.S. Iztacala recibiendo alimento y agua *ad libitum*.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de 3 conejos cada uno como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Grupos experimentales. N=3

Grupo	Nombre del grupo	Descripción del Tratamiento	Duración del tratamiento
1	Control 6	-----	6 meses
2	Grasa 6	Alimento convencional adicionado con 3% de ácido palmítico.	
5	Control 12	-----	12 meses
6	Grasa 12	Alimento convencional adicionado con 3% de ácido palmítico.	

Transcurrido el tiempo respectivo (6 y 12 meses) los animales fueron sacrificados por dosis letal intraperitoneal de pentobarbital sódico (63mg/2.5kg de peso) y se les extirpó el hígado, el cual fue mantenido en congelación a -70 °C hasta su utilización.

Estandarización de oligonucleótidos

En el laboratorio de Inmunología, UMF se diseñaron oligonucleótidos específicos para el RNAm de cada una de las moléculas a evaluar. Las secuencias de los genes (IL-6, IL-10 y TNF- α , así como del gen control interno (GAPDH) se buscaron en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Utilizando el algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se realizó la comprobación teórica del funcionamiento de los oligos, su especificidad, así como la obtención de la longitud del producto.

Posteriormente, para evaluar la viabilidad y especificidad de los oligonucleótidos se realizaron reacciones de PCR a dos temperaturas de disociación (58 y 60 °C) sobre RNA de un organismo control. El control positivo de la reacción empleado en la reacción en cadena de polimerasa fue GAPDH con sus oligonucleótidos respectivos diseñados previamente en el laboratorio.

Posteriormente, para observar los resultados de la PCR se hicieron migraciones electroforéticas en gel de agarosa al 2.5% utilizando el marcador molecular (Gene ruler) de 50 pb y GAPDH como control.

Extracción de RNA

Se descongeló aproximadamente 1 cm³ de hígado de cada una de las muestras para extraer el RNA mediante un protocolo con fenol ácido y buffer AE.

Seguidamente, por espectrofotometría con una longitud de onda de 260 nm, se midió la concentración de RNA obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l RNA} = (\text{abs}) (\text{dil}) (\text{cte})$$

En donde: abs, absorbancia; dil, dilución a la que se encontraba la muestra; cte, constante equivalente a 0.040.

Transcripción Reversa

(Cadena complementaria del DNA)

El RNA extraído de cada tejido se utilizó como molde para la síntesis de la copia complementaria del DNA (cDNA) mediante una reverso transcripción (rT PCR) bajo las condiciones de corrida siguientes:

a) Desnaturalización del RNA a 65°C por 5 minutos con las concentraciones: RNA 1 µg, Random hexamers 1 µl, dNTP's 1 µl, H₂O DEPC cbp 5µl.

b) Amplificación a 50°C por 90 minutos conteniendo buffer 5x, DTT 1 µl, RNAsa OUT 1 µl, Enzima reverso transcriptasa 1 µl y H₂O DEPC cbp 20 µl.

Evaluación de los productos mediante PCR punto final.

Una vez obtenido el cDNA se amplificaron las secuencias de las tres moléculas a evaluar (IL-10, IL6 y TNF - α) mediante PCR empleando Buffer 10x, MgCl₂ 1 µl, dNTP's 1 µl, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos específicos (Fw y Rv como se muestra en la tabla 3), H₂O DEPC cbp 20 µl, Taq polimerasa 1 unidad y 1 µl de cDNA. El control empleado fue GAPDH con los oligonucleótidos mencionados arriba.

Las especificaciones del programa de corrida fueron:

A) Desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos, B) 35 ciclos comprendiendo una desnaturalización a 94°C por treinta segundos, seguido de 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72°C. C) Extensión final a 72°C 5 minutos.

Para registrar la correcta síntesis de cDNA y su amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % utilizando la escalera molecular de 1kb.

PCR de tiempo real

Una vez obtenido el cDNA de los 4 grupos experimentales (N=3) se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su utilización como templado en las reacciones de PCR en tiempo real o qPCR (*quantitative PCR*, por sus siglas en inglés). Cada muestra se trabajó por triplicado.

Antes de procesar las muestras experimentales se realizó una curva de disociación desde los 60 hasta los 95°C a intervalos de 3°C para determinar Ct a la cual comienzan a observarse los amplificadores deseados y con especificidad.

Para todos los casos se empleó un Master Mix 2x que contenía Sybr Green, Taq pol y MgCl₂ (Invitrogen), oligonucleótidos Fw y Rv 0.5 µl de cada uno, cDNA 1 µl y H₂O DEPC cbp 15 µl según las especificaciones del fabricante.

Las condiciones de amplificación fueron iguales en todos para las tres moléculas (IL-10, IL-6 y TNF-α) y el control (GAPDH): paso inicial de 15 min a 95°C, después 40 ciclos a 95°C por 15 segundos seguidos por 1 min a 60°C.

El análisis de la expresión génica relativa se realizó con los valores de Ct obtenidos de cada uno de los genes y de GAPDH como control interno (gen constitutivo) mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análisis estadístico

Después de la normalización de datos se utilizó el programa Graph Pad Prisma 6.0 para analizar la expresión relativa de los genes mediante el estadístico ANOVA de una entrada y la prueba de T ; el valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Diseño de oligonucleótidos y estandarización.

Una vez encontradas las secuencias de los oligonucleótidos específicos (tabla 3), se buscó su comprobación teórica mediante Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) como se mencionó anteriormente y secuenciados por Invitrogen.

Nombre del Oligonucleótido específico (Fw, Forward; Rv, Reverse)	Secuencia	Longitud del amplificado
TNF- α Fw	5' AGGTTGTCTCACTAATGCTGA 3'	118 pb
TNF- α Rv	5' AGTCTTTATTTCTCGCCACTG 3'	
IL-6 Fw	5' GACCTGCCTGCTGAGAATC 3'	105 pb
IL-6 Rv	5' ATGCTGACCCTGGTGTTTTTC 3'	
IL-10 Fw	5' CTCCCCTGTGAAAACAAGAG 3'	185 pb
IL-10 Rv	5' TCCTAGACTCTAGCCGAGTT 3'	
GAPDH Fw	5' CCATGACTGCCACCCAGAAA 3'	109 pb
GAPDH Rv	5' GGGATCGTCGTGACCACGTC 3'	

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para las moléculas TNF- α , IL6 e IL-10. Se muestran las secuencias Forward (Fw) y Reverse (Rv) de las tres moléculas a evaluar, así como la longitud de los productos respectivos.

Para verificar el correcto diseño de los oligonucleótidos se realizaron reacciones de PCR sobre el cDNA de un organismo sin tratamiento a dos temperaturas de disociación (58 y 60 °C).

Debido a que no se encontraron amplificaciones en dicho organismo, se decidió replicar un modelo en el que ya se conoce que sí se expresa el RNAm de nuestras moléculas

de interés. Para ello se obtuvo un conejo de 2 kg al que se le inyectó LPS a una concentración de 0.1mg/kg de peso (Masaki 2004). Pasadas 6 hrs se sacrificó al organismo para extirparle el hígado ya que Yang en 1997 expone que es un tiempo en el que se puede observar el mensajero de las moléculas en cuestión. De igual forma, se llevó a cabo la extracción del RNA, la obtención del cDNA y la PCR de punto final.

Los resultados de la PCR se sometieron a una migración electroforética en gel de agarosa al 2.5%, con lo que se demostró que los oligonucleótidos diseñados amplificaron un solo producto, sin fragmentos inespecíficos. De esta forma se comprobó la especificidad de los genes de interés: IL-6 y TNF- α a una temperatura de disociación de 60 °C, mientras que IL-10 a 58 °C (Figura 6).

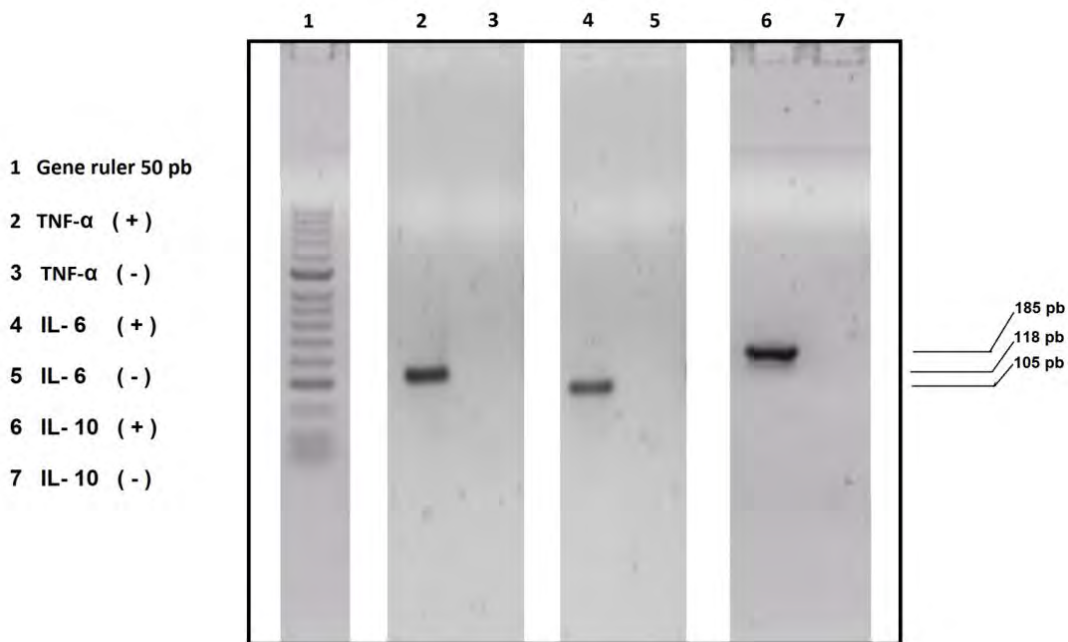


Figura 6. Gel de agarosa al 2.5% para verificar la correcta amplificación de IL-10, IL-6 y TNF- α utilizando oligonucleótidos específicos. Se manejó la escalera de 50 pares de bases como marcador molecular (carril 1). Se observa la banda correspondiente para cada gen (carriles 2, 4 y 6) así como su control negativo (carriles 3, 5 y 7) a una temperatura de disociación de 60°C para IL-6 y TNF- α y a una temperatura de 58°C para IL-10.

Obtención del cDNA

Una vez diseñados y validados los *primers* se procedió a trabajar con los grupos experimentales como se mencionó anteriormente (extracción de RNA, cuantificación, obtención del cDNA y amplificación por PCR punto final). Para demostrar que los procesos arrojaron resultados positivos se realizó una migración electroforética utilizando el gen control GAPDH, lo cual se puede observar en la figura 7.

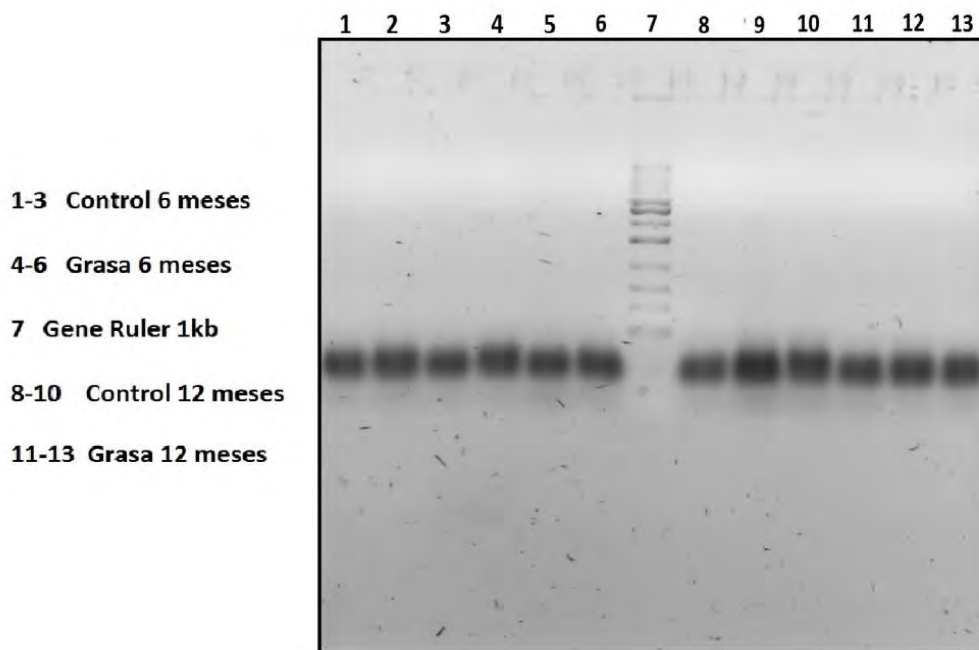


Figura 7. Verificación de la calidad del RNA y del funcionamiento correcto del proceso. Se realizó una migración electroforética en gel de agarosa al 2.5% de los productos de la PCR utilizando la escalera o *Gene Ruler* de 1kb. Los fragmentos se observan de pb correspondientes al amplicón de GAPDH.

Como se puede observar en la imagen anterior, los productos de la PCR o amplicones de los cuatro grupos experimentales tienen el tamaño esperado (109 pb) correspondiente al gen GAPDH. Una vez demostrada la especificidad de la reacción, el cDNA se almacenó a -3°C hasta el momento de su uso como templado para la reacción de PCR en tiempo real.

Curvas de disociación

El cDNA se utilizó como templado en las reacciones de la qPCR. Primeramente se realizaron las curvas de disociación a intervalos de 3 unidades desde los 60 hasta los 95°C. De esta forma se pudo apreciar la T_m en la que se presenta el fragmento de amplificación de cada uno de los genes.

En la figura 8 se observa un solo pico de disociación para el GAPDH a 85.12 °C, para la IL-10 a 79.35 °C, IL6 a 82.78 °C, y TNF- α a 82.91 °C, lo que significa la amplificación específica del producto ya que hay ausencia de picos secundarios correspondientes a dímeros de los *primers* o fragmentos inespecíficos en ninguno de los genes estudiados. Nota: En la curva de disociación de IL-10 se observa una ligera irregularidad aproximadamente a 67°C, sin embargo pasada dicha temperatura el producto inespecífico desaparece.

Expresión relativa

Una vez comprobada la especificidad y la temperatura de disociación se utilizó el cDNA de todos los grupos experimentales, para evaluar la expresión relativa de IL-10, IL-6 y TNF- α , comparados con la expresión del gen de control GAPDH. El correcto nombre del proceso de cuantificación es RT-qPCR ya que es una PCR cuantitativa que parte de cDNA obtenido a partir de RNA por Transcripción reversa (Tamay, *et al.*, 2013).

Los resultados de cada uno de los tres genes se normalizaron por separado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen, 2008) como se indica en la siguiente fórmula:

$$1) \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_g - \Delta Ct_c \quad 2) \Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})$$

En donde: *g*, grupo con el tratamiento de *grasa*; *c*, *control*; *gen*, ya sea IL-10, IL-6 o TNF- α ; *GAPDH*, gen constitutivo utilizado como control interno. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar.

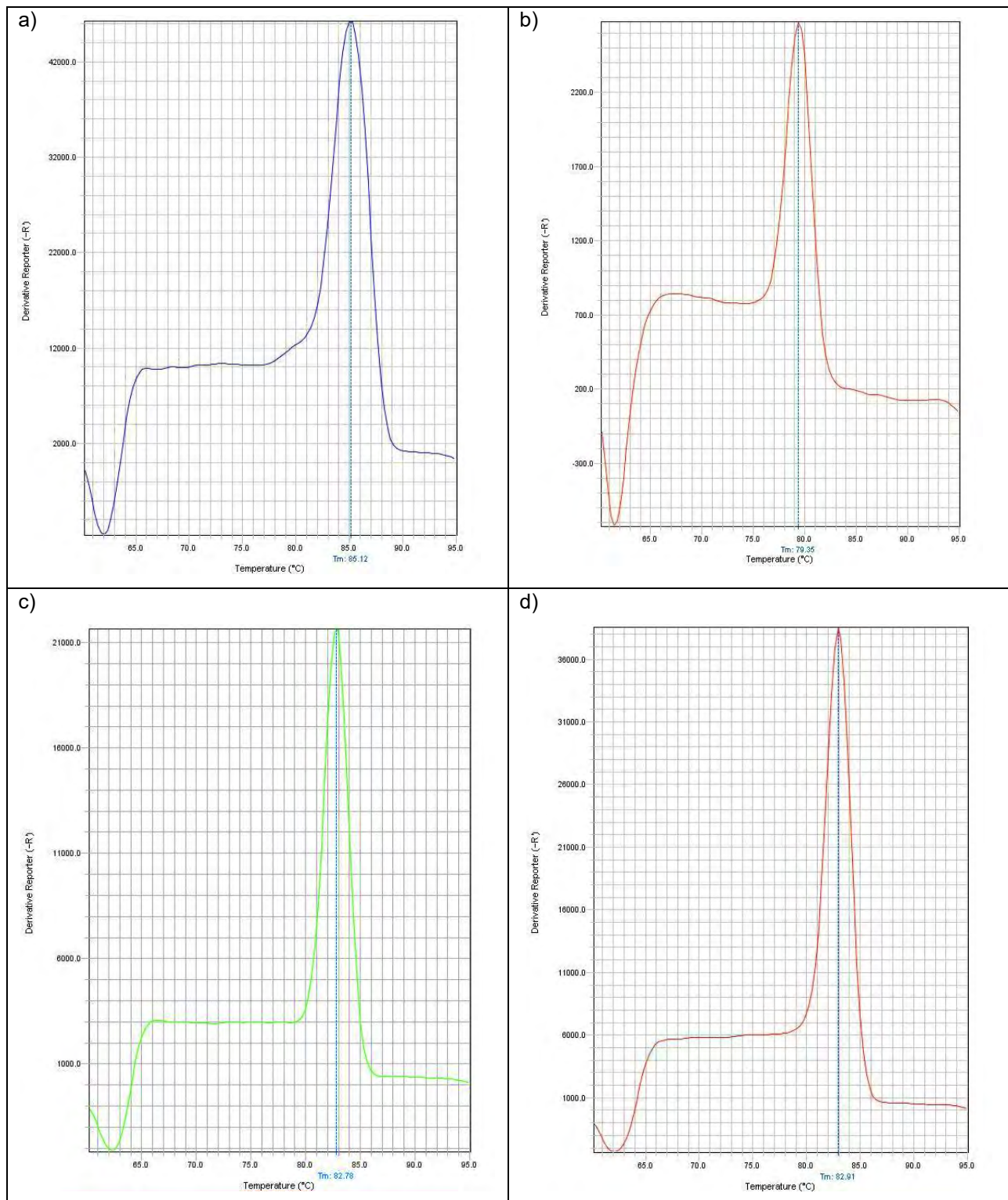


Figura 8. Curva de disociación o melt curve. a) GAPDH, b) IL-10, c) IL-6, d) TNF- α . Se observa un pico en cada gráfica que corresponde a la amplificación de un solo producto a cierta Tm: 85.12, 79.35, 82.78, y 82.91 °C respectivamente, lo cual indica la especificidad de la reacción.

Comparativo entre moléculas y sus controles a los 6 meses de tratamiento.

Como se aprecia en la figura 9, los mensajeros de las interleucinas 6 y 10 no fueron encontrados en los organismos tratados durante seis meses tanto en los controles como en los organismos bajo dieta grasa.

Por el contrario, el mensajero del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) sí fue encontrado tanto en los organismos control como en los tratados con grasa, teniendo en estos últimos 1.39 veces mayor expresión. Según el análisis estadístico la diferencia es significativa entre el grupo control y el grupo con dieta grasa a 6 meses de tratamiento (P 0.0213).

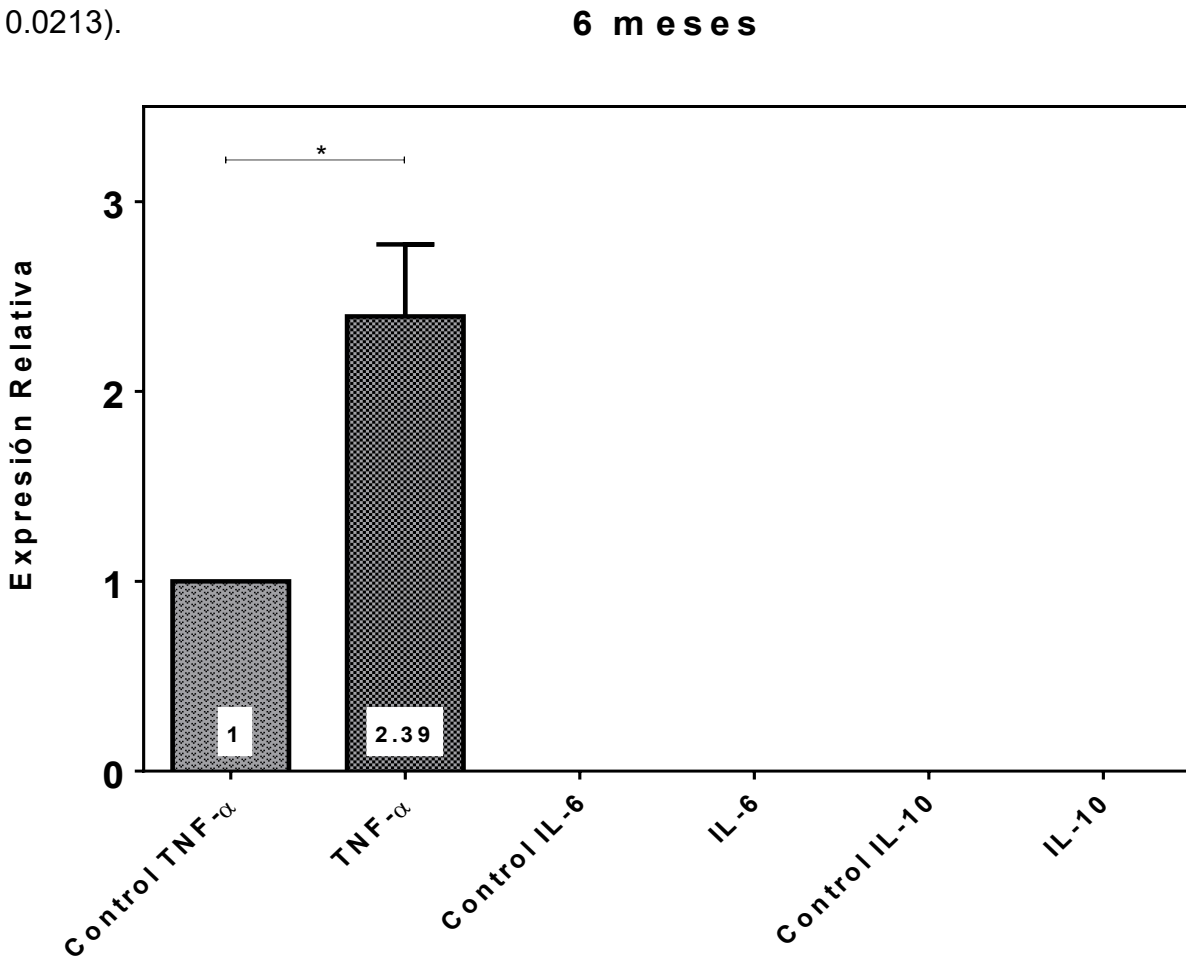


Figura 9. Expresión relativa de IL-10, IL-6 y TNF- α en grupos control y grupos con dieta grasa a seis meses de tratamiento. Existe una diferencia significativa para el mensajero de TNF- α entre el grupo tratado con grasa y el no tratado (P 0.0213).

Comparativo entre moléculas y sus controles a los 12 meses de tratamiento.

Como se puede observar en la figura 10, a doce meses de tratamiento en los organismos control sólo se expresó el RNAm de TNF- α . A diferencia del tratamiento a seis meses, a los doce sí se observaron las tres moléculas (TNF- α , IL6 e IL-10) en los grupos tratados con grasa.

Existe una diferencia de 0.06 puntos menor en el grupo alimentado con grasa respecto a su control, sin embargo la diferencia no es significativa (P 0.8973). En cuanto a las moléculas IL 6 e IL-10 sí existe una diferencia significativa (P <0.0001 y P 0.0131, respectivamente).

Gráfica 2
12 meses

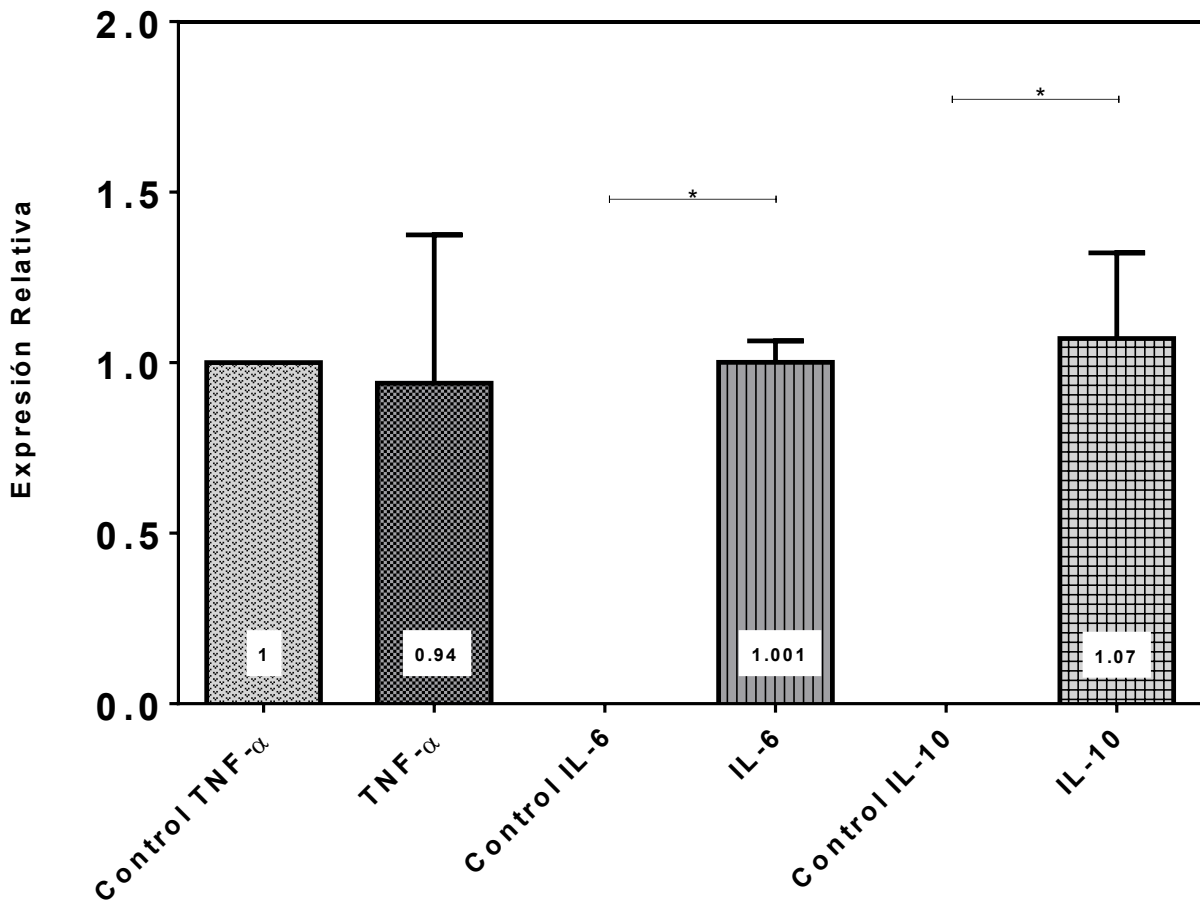


Figura 10. Expresión relativa de IL-10, IL-6 y TNF- α en el grupo control y el grupo con dieta grasa a doce meses de tratamiento. Existe diferencia significativa entre IL-6 (P <0.0001) e IL-10 (P 0.0131) respecto a sus correspondientes controles.

Comparativo entre las moléculas a los dos tiempos de tratamiento.

Como se mencionó antes, los mensajeros de IL-6 e IL-10 solamente se observaron a los doce meses de tratamiento. En cambio, el mensajero de TNF- α se registró en ambos tiempos (6 y 12 meses) (Figura 11).

Primeramente, se compararon los controles de 6 y 12 meses, entre los cuales no hubo diferencia significativa, por lo que en la gráfica arriba mencionada (figura 11) sólo se muestra la media de los controles, utilizada para normalizar los demás grupos.

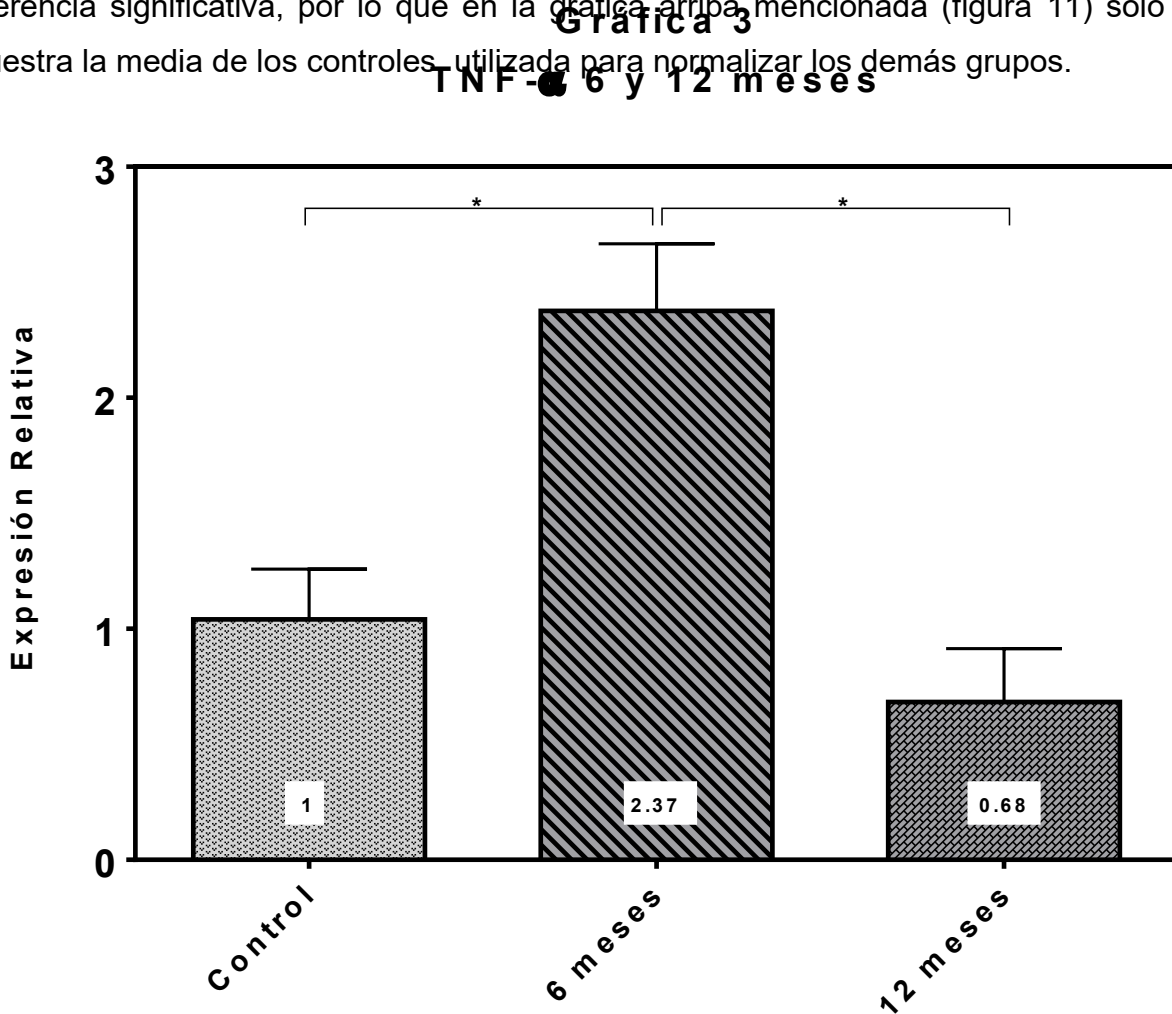


Figura 11. Comparación de la expresión relativa de TNF- α entre los dos tiempos (6 y 12 meses) de alimentación con 3% de ácido palmítico, así como con en el grupo control.

Así bien, después de dicha normalización de los valores de TNF- α se realizó el análisis estadístico en donde se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con

grasa a los 6 y 12 meses, así como entre el control y el grupo a 6 meses de grasa, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el grupo alimentado con grasa por 12 meses y el control.

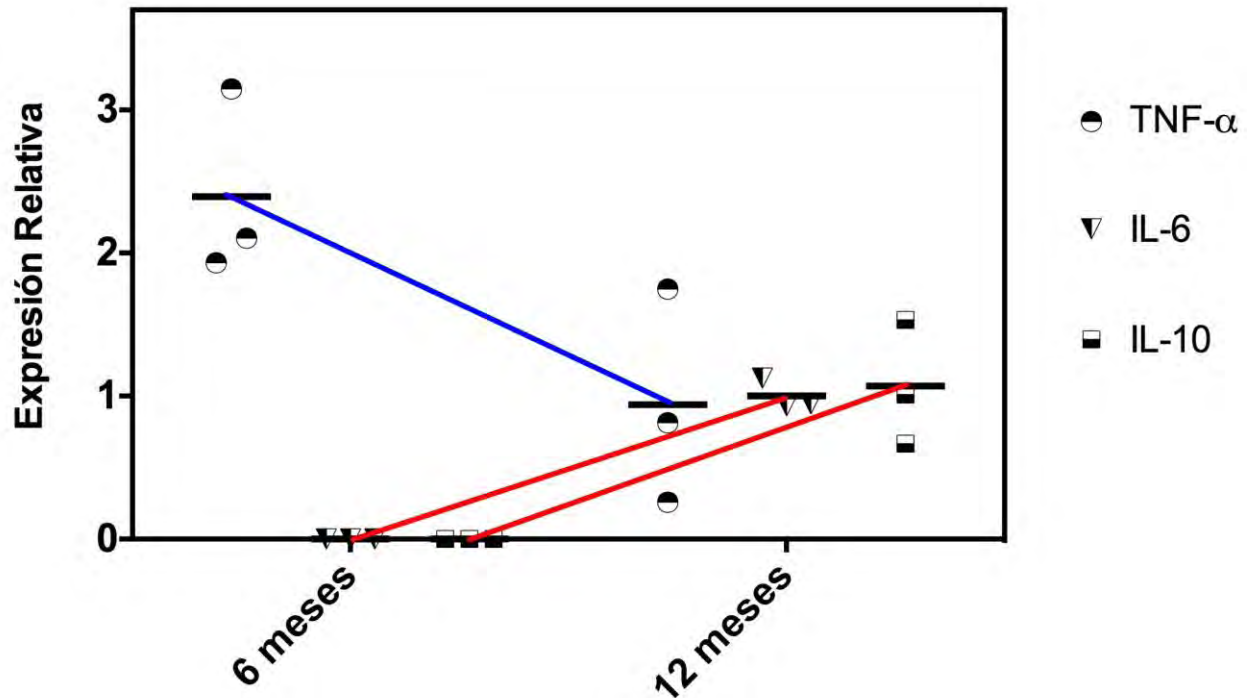


Figura 12. Cambio en la expresión relativa de RNAm de las tres moléculas los dos tiempos de tratamiento (seis y doce meses) bajo la alimentación con ácido palmítico. Líneas negras horizontales hacen referencia a las medias. Las líneas rojas indican aumento en la expresión (IL-6 e IL10), mientras que la línea azul señala una disminución (TNF- α).

En la figura 12 se muestran los datos de la IL-10, IL-6 y TNF- α , así como la media de cada uno de los organismo de los grupos alimentados con grasa durante seis y doce meses. Se pretende observar con claridad si hay aumento (como en el caso de la IL-6 y la IL-10) o disminución (TNF- α) la expresión del RNAm.

En cuanto a IL-6 e IL_10 se observa que en los grupos con tratamiento a seis meses no hubo expresión, mientras que al continuarse a doce meses están presentes ambas moléculas. Por el contrario, la expresión del RNAm de TNF- α disminuye con el paso del tiempo de exposición al alimento grasa.

DISCUSIÓN

En el cuerpo, los ácidos grasos son componentes esenciales que sirven como fuente de energía, forman parte de la estructura membranal, son necesarios en la síntesis de hormonas, además de ser mediadores en la señalización celular (Liu y Czaja 2013). Así también, el mantenimiento de las cantidades adecuadas de AGL es crítica para el buen funcionamiento y la supervivencia celular, mientras que la acumulación excesiva puede causar efectos nocivos a la salud, a través de diversas respuestas celulares como la lipotoxicidad, la cual, como ya se ha reportado (Park 2014), puede llevar al desarrollo de una respuesta inflamatoria.

De esta forma, los marcadores de la inflamación están asociados con un gran número de patologías del SM con la calidad de la dieta, por ejemplo una alta en grasas, especialmente las saturadas. Como ya se ha venido describiendo, el ácido palmítico es un ácido graso saturado de dieciséis carbonos cuya ingesta, en comparación con otros lípidos, se ha relacionado con la obesidad y la inflamación (Laugerette 2012).

Durante el proceso inflamatorio ocurre un depósito en el tejido adiposo y la consecuente secreción de adipocinas del tejido abdominal y subcutáneo que probablemente contribuye al aumento en el riesgo de las complicaciones metabólicas y cardiovasculares (Thaman y Arora, 2013), así como el desarrollo de patologías como esteatosis y esteato hepatitis no alcohólica debido la deposición de lípidos en los llamados sitios ectópicos, además de que puede contribuir a la producción de mediadores de la inflamación debido a la dieta aún en la ausencia de obesidad (Khalil 2012).

Lo anterior puede explicarse con la correlación entre la obesidad o acumulación lipídica, el aumento en los ácidos grasos en circulación y esteatosis hepática en donde se ve incrementada tanto la lipólisis como la entrega de ácidos grasos al hígado (Joshi-Barve 2007). Las investigaciones previas de este tema no son vastas y además las moléculas inflamatorias han sido evaluadas en circulación, en pacientes que ya han

desarrollado el Síndrome Metabólico, en donde sólo se denota el daño provocado, más no el inicio de la enfermedad.

Así, en el presente estudio el tratamiento con ácido palmítico al que fueron expuestos los individuos provoca que exista una acumulación de lípidos en el tejido adiposo y a su vez la exportación de ácidos grasos libres para su deposición ectópica en hígado, desencadenándose una cascada de eventos incluyendo el proceso inflamatorio. Este tipo de ácidos grasos saturados interfieren en cascadas de señalización que estimula factores de transcripción relacionados con el proceso inflamatorio, tal como NF- κ B (Sachithanandan 2011) activados por diversos receptores que captan AGL. De esta forma, los AGL son moduladores de la inflamación y participan la producción de citocinas como IL-6 y TNF- α (Das y Balakrishnan 2011).

En este trabajo el órgano evaluado fue el hígado pues además de que juega un papel crucial en el metabolismo de los lípidos, es uno de los órganos más afectados debido a la exposición elevada de ácidos grasos (Liu, et al., 2014); cuya característica más destacable es la inflamación (Hur 2015).

La mayoría de los estudios antes comentados se han realizado *in vitro* con cultivos de células hepáticas expuestas durante algunas horas a una solución de AP en concentraciones muy elevadas. El actual estudio evalúa un modelo animal que valdría considerarse homólogo a la etiología de la enfermedad (SM e HGNA) en humanos y cambios en la homeostasis en etapas tempranas ya que se administra *in vivo* una concentración del 3% de AP, que podría aproximarse al consumo habitual en dietas enriquecidas en grasa. Así mismo, estos fenómenos son crónicos (evaluados a 6 y 12 meses), no agudos como se ejecuta en otros experimentos antes mencionados.

Las moléculas inflamatorias inducidas por la dieta pueden conducir a complicaciones tales como hígado graso, hipertensión, arterioesclerosis, dislipidemia, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial, entre otras (Fuentes *et al.* 2013, Minihane *et al.* 2015, Staiger *et al.* 2004), lo cual nos acerca a los fenómenos que seguramente están ocurriendo en el modelo desarrollado en este trabajo.

En cuanto a la molécula TNF- α se ha mencionado en un estudio realizado por Hur y colaboradores en el 2015 que está en correlación positiva con la progresión del daño hepático. Es así como se puede sugerir que en nuestro modelo, los conejos alimentados con el 3% de ácido palmítico seguramente presentan esteatosis, lo que podría ser confirmado histológicamente.

El experimento fue diseñado para evaluar la expresión transcripcional de moléculas involucradas en la inflamación (RNAm) en hígado, lo que evidenciaría una respuesta muy temprana ante el estímulo de los AGL provenientes de la dieta. Cabe señalar que existen publicaciones que indican que al monitorear los mensajeros y las proteínas respectivas, la tendencia de producción se observa igual en ambos casos (Joshi-Barve 2007, Zhou 2013). Así bien, cuando hablamos de aumento o disminución del RNAm de IL-10, IL-6 y TNF- α , podría significar igual producción de sus proteínas.

El comparativo de las moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio mostró a los 6 meses de tratamiento con 3% (figura 6) de AP que no hay presencia de RNAm de las Interleucinas 6 y 10, a diferencia de la evaluación a los 12 meses (Figura 10), en donde sí se presentan en el grupo tratado con dieta grasa. A diferencia de lo encontrado, se hubiera esperado que en el primer tiempo (6 meses) ya se observaran las dos moléculas como inflamatoria (IL-6) y antiinflamatoria (IL-10), involucradas en el proceso inflamatorio debido al estímulo del ácido graso saturado.

En cambio, la presencia de TNF- α sí fue registrada de manera continua tanto en los animales controles como en los tratados (Figura 11). De la misma forma fue evidenciado por Hur y colaboradores en 2015 a partir de su modelo murino bajo una alimentación con AP así como el un cultivo *in vitro*. Además, en dicho estudio demuestran que el AP induce la expresión de esta molécula inflamatoria mediante las vías AMPK/AKT/NF κ B, sugiriendo que a mayor tiempo de exposición al AP, mayor producción de moléculas inflamatorias. Comparando nuestros resultados con lo anterior, se hubiera esperado que existiera un aumento, no una disminución en la expresión de TNF- α debido a la infiltración excesiva y crónica de ácidos grasos libres al

hígado. Esto probablemente pueda ser explicado por la presencia de moléculas antiinflamatorias, como se describe a continuación.

Existen reportes de una correlación negativa entre TNF- α y la Interleucina 10, lo cual se asocia con la progresión de HGNA (Vonghia *et al.* 2015, Zahran *et al.* 2013). Respecto a los resultados obtenidos se notó que a los 6 meses de ingerir la dieta grasa, aunque probablemente hubo una acumulación lipídica en el hígado, IL-10 no se expresó (Figura 9). Por el contrario, a los doce meses de ingesta de ácido palmítico (Figura 10), TNF- α no presentó cambios significativos con respecto a su control y en cuanto a la interleucina 10, su expresión tardía (a los 12 meses de tratamiento) puede significar una respuesta al estímulo de inflamación, es decir a la presencia continuada de TNF- α que viene desde los 6 meses. Dicho de otra manera, a los 6 meses sólo se observa la presencia de TNF- α ya que es posible que inhiba la secreción de IL-10 (*ibídem*), mientras que a los 12 meses se observan ambas, siendo la IL-10 anti inflamatoria en respuesta a la producción continuada del Factor de Necrosis Tumoral alfa ya que actúan en la misma vía (Zahran *at al.* 2013), lo cual da como resultado la disminución de éste al último tiempo de evaluación (Figura 12).

En cuanto a la IL-6, se hubiera esperado que esta citocina se observara desde el primer tiempo de medición, sin embargo no se expresó tal vez debido a que el estímulo de TNF- α vía NF κ B (Ingaramaro *et al.*, 2013) no fue suficiente para inducirla. Existe evidencia de que en individuos con sobrepeso la concentración de ácidos grasos en suero está asociada positivamente con IL6, en donde a mayor tiempo de exposición, mayor expresión del mensajero (Calder 2011). Lo anterior posiblemente explica que la IL-6 no se haya registrado al primer tiempo de medición (figura 9), lo cual sugeriría que se requiere un mayor tiempo de exposición o concentración del AP.

Por otra parte, es bien sabido que de manera habitual la Interleucina 6 es considerada como molécula inflamatoria, sin embargo, algunos estudios indican que dependiendo del tipo de estímulo, su concentración y el tiempo de exposición a éste, puede actuar como inmuno moduladora (Scheller *et al.*, 2011)..

Así bien, aunque se sabe TNF- α e IL-6 inducen resistencia a la insulina, se podría analizar el efecto inmuno modulador pues en algunos estudios (Sachithanandan *et al.*, 2011, (Heinrich2003, Taub, 2003, Heinrich, 2003, Scheller, 2011, Petersen y Pedersen, 2006, Carey, 2004) reportan que elevaciones crónicas de IL-6 promueven a nivel sistémico la sensibilidad a la insulina y la leptina, la disposición de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos en músculo de roedores y en cultivos de células hepáticas, lo cual, en el presente trabajo podría significar una atenuación de los daños producidos por TNF- α . Así, la expresión de IL-6 no a los 6 sino hasta los 12 meses de tratamiento con AP podría manifestarse como una producción compensatoria ante el estímulo inflamatorio de TNF- α . De manera independiente, Calder y colaboradores (2011) comentan sobre un estudio en el que se observa un ligero y un rápido incremento en la expresión de IL-6 y TNF- α , respectivamente, en relación a la ingesta alta en grasas, la ganancia de peso y a la progresión del HGNA. Por el contrario, al bajar de peso y modificar la dieta se observa que TNF- α decrece rápidamente, mientras que IL-6 permanece y posteriormente disminuye lentamente. Esto apoya nuevamente la idea de que la expresión de IL-6 hasta los 12 meses posiblemente se deba a que intenta competir con TNF- α (Figura12), logrando amortiguar o en este caso detener la progresión del daño hepático. Es importante hacer mención de que los modelos utilizados son diferentes a los del presente trabajo, lo que solamente dan una idea de lo que podría ocurrir, mismo que puede plantear futuras investigaciones.

De manera global se observa que el ácido palmítico ocasiona una activación de la respuesta inflamatoria en hígado y el consecuente control o disminución. Como se aprecia en la figura 11, se encontró una relación negativa entre TNF- α (inflamatoria) y la Interleucina 10 (antiinflamatoria). Es aquí donde surge la pregunta de qué pasará con la regulación de la inflamación si continúa la ingesta de este lípido. Así, la idea de avance en campos pulsantes (Burstein *et al.* 2013) cobra sentido pues cuando los inductores de la inflamación empiezan a elevarse, los antiinflamatorios se encuentran suprimidos; y, cuando estos últimos logran elevarse, provocan que los inflamatorios disminuyan, sin embargo, como el estímulo (AP) es continuo y posiblemente los daños al organismo no se detienen, las moléculas se incrementan más su expresión (Figura 13).

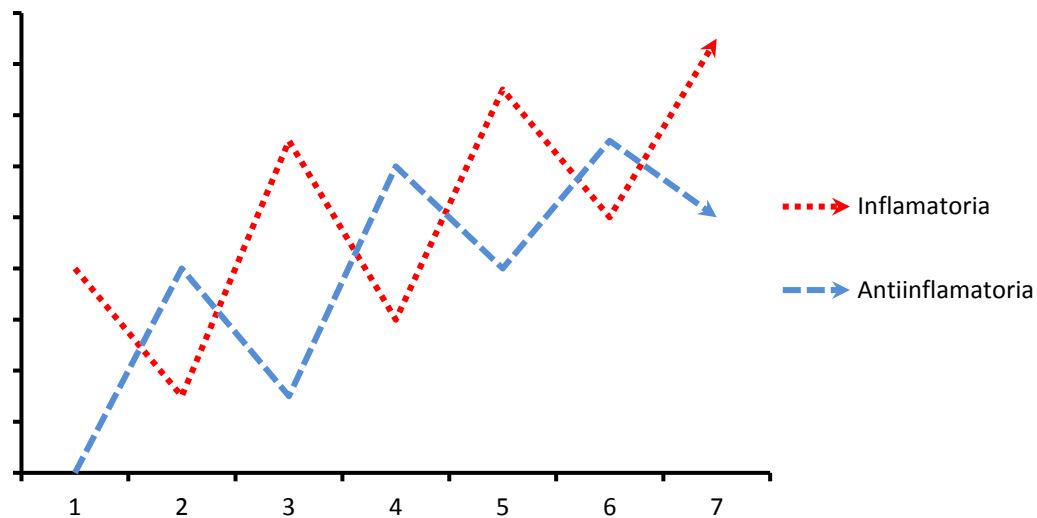


Figura 13. Ejemplificación del modelo de avance en campos pulsantes. Se propone el modelo de avance en campos pulsantes para explicar el comportamiento de la producción de moléculas pro y anti inflamatorias en hígado con respecto al tiempo de exposición a ácido palmítico. Se observa que cuando los inductores de la inflamación empiezan a elevarse, los antiinflamatorios se encuentran disminuidos y viceversa; sin embargo, como el estímulo (AP) es continuo y posiblemente los daños al organismo no se detienen, la expresión de las moléculas es mayor a cada tiempo de exposición.

Los datos e ideas surgidos de este trabajo pueden conducir a la aproximación de una medicina traduccional. Esto se refiere a que, dado el modelo experimental que trata de recrear lo que sucede bajo una ingesta crónica y enriquecida en lípidos, es posible extrapolar los resultados al humano y de esta manera promover la búsqueda de una terapia temprana que atienda el inicio del fenómeno inflamatorio (la producción de moléculas transcripcionales inflamatorias -RNAm- como IL-6 y TNF- α).

CONCLUSIONES

- ❖ La ingesta crónica (6 y 12 meses) del 3% de ácido palmítico juega un papel importante en el inicio y progresión de un fenómeno inflamatorio temprano, evidenciado por las moléculas IL-10, IL-6 y TNF- α .
- ❖ En el proceso inflamatorio el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), como respuesta al tratamiento crónico con 3% de ácido palmítico, aumenta su expresión transcripcional con respecto al control a los 6 meses; mientras que para las interleucinas 6 y 10 no se observa su presencia.
- ❖ A los 12 meses de tratamiento TNF- α disminuye su expresión transcripcional, probablemente debido a la producción de las moléculas antiinflamatorias IL-10 e IL-6.
- ❖ Se observa una relación negativa de la expresión transcripcional de TNF- α con respecto a la IL-6 lo cual podría sugerir propiedades inmuno moduladoras de esta última.
- ❖ Al medir la expresión transcripcional de los marcadores de la inflamación directamente en hígado nos da una idea muy temprana de este fenómeno, lo cual es de suma importancia ya que puede conducir la búsqueda de una terapia que permita tratar el origen y progresión tanto del hígado graso no alcohólico, así como del mismo síndrome metabólico y otras de sus complicaciones.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye un acercamiento al estudio del fenómeno inflamatorio de manera muy temprana en hígado causado por la ingesta crónica adicionada con 3% de un ácido graso saturado (AG), ya que se desarrolló bajo condiciones aproximadas a lo que podría ser un consumo cotidiano de ácido palmítico por personas con dieta alta en grasas, además de que las evaluaciones de las moléculas inflamatorias se realizaron directamente en hígado y no en circulación.

Dado que existen reportes de una correlación entre un aumento en la concentración de ácidos grasos y la progresión del HGNA, sería conveniente no sólo observar el fenómeno inflamatorio asociado, sino también el nivel sérico y en hígado de los AGL. Además, como ya se mencionó, se sugiere verificar un estudio histológico para confirmar la correlación del avance del daño hepático con las moléculas inflamatorias.

Por otra parte se han mencionado las posibles rutas de acción de las moléculas inflamatorias para cuya comprobación se puede realizar un estudio utilizando inhibidores específicos.

Por último, dado que el fenómeno inflamatorio puede conducir a complicaciones tales como hígado graso, hipertensión, arterioesclerosis, dislipidemia, resistencia a la insulina, diabetes, disfunción endotelial, entre otras, sería complementario el realizar las pruebas correspondientes para dar idea del fenómeno global.

LITERATURA CITADA

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). Pcr. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos*, 175–202.
- Alberti K.G., Zimmet P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 15, 539–553.
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., ... Smith, S. C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation*, 120(16), 1640–1645. <http://doi.org/10.1161/circulationaha.109.192644>
- Aschner P. (2010). Metabolic syndrome as a risk factor for diabetes. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 8, 407-12.
- Barbaresko, J., Koch, M., Schulze, M. B., & Nöthlings, U. (2013). Dietary pattern analysis and biomarkers or low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutrition Reviews*, 71(8), 511-527.
- Bradbury, M. W. (2006). Lipid Metabolism and Liver Inflammation. *Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G194-G198.
- Calder, P., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K. (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106.
- Carey, A. L., & Febbraio, M. A. (2004). Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*, 47(7), 1135–1142. <http://doi.org/10.1007/s00125-004-1447-y>

- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.
- Costa-Pereira, A. P. (2014). Regulation of IL-6-type cytokine responses by MAPKs. *Biochemical Society Transactions*, 42, 59–62. <http://doi.org/10.1042/BST20130267>
- Cruz U., R., Barrera M., F., & Arrese J., M. (2014). Obesidad e hígado graso no alcohólico. *Gastroenterol. Latinoam* 25 (supl.1), S65–S69. <http://gastrolat.org/DOI/PDF/10.0716/gastrolat2014s100016.pdf>
- Das, S. K., & Balakrishnan, V. (2011). Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(2), 202–209. <http://doi.org/10.1007/s12291-011-0121-7>
- Day CP & James OF. (1998). Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*, 114:842-845.
- Emanuela, F., Grazia, M., Marco, D. R., Maria Paola, L., Giorgio, F., & Marco, B. (2012). Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/476380>
- Fattore, E. and R. Fanelli. (2013). *Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity*. *Int J Food Sci Nutr*. 64 (5), 648-59.
- Fattore, E., Bosetti, C., Brighenti, F., Agostoni, C., & Fattore, G. (2014). Palm oil and blood lipid – related markers of cardiovascular disease : a systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. *Am J Clin Nutr*, 99:1331–50.
- Fernandez-Real JM & Pickup JC (2008) Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19, 10–16.
- Fuentes, E., Fuentes, F., Vilahur, G., Badimon, L., & Palomo, I. (2013). Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/136584>

- Galland, L. (2010). Diet and inflammation. *Nutr Clin Pract*, 25, 634-640.
- García Torres D, Castellanos-González M, Cedeño-Morales R, Benet-Rodríguez M, Ramírez-Arteaga I. (2011) Tejido adiposo como glándula endocrina. Implicaciones fisiopatológicas. *Revista Finlay*, 1 (2), 1-20. <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/39>
- Glocker, E, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci.*, 1246:102-7. <http://doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06339>
- Grundy, S. M. (2008). Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(4), 629–636. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151092>
- H. Staiger, K. Staiger, N. Stefan et al., “Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells,” *Diabetes*, vol. 53, no. 12, pp. 3209–3216, 2004.
- Harford, K. a, Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C., & Roche, H. M. (2011). Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 70(4), 408–17. <http://doi.org/10.1017/S0029665111000565>
- Hauner, H. (2005). Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(02), 163–169. <http://doi.org/10.1079/PNS2005428>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1), 1–20. <http://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.

- Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91. <http://doi.org/10.1126/science.7678183>
- Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB (2007). Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*;82(2):237-43
- Hu, F. B. (2002). Dietary patten analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Current Opinion in Lipidology*, 13, 3-9.
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2 (5-6), 231–237. <http://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Ingaramo, P., Francés, D., Ronco, M., & Carnovale C. (2013). Diabetes and Its Hepatic Complication, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases, Dr. Monica Fedele (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53684. Available from: <http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-diseases/diabetes-and-its-hepatic-complication>
- International Diabetes Federation. (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome*, 28, 1–7. <http://doi.org/10.1159/000282084>
- Joshi-Barve, S., Barve, S. S., Amancherla, K., Gobejishvili, L., Hill, D., Cave, M., ... McClain, C. J. (2007). Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*, 46(3), 823–830. <http://doi.org/10.1002/hep.21752>
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/943162>

- Khalil, O. (2012). Level of Pro-and Anti-inflammatory Cytokines In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Egyptian Patients. *Ijrm*, 2(2), 233–242. Retrieved from <http://www.iracst.org/ijrmt/papers/Vol2no22012/16vol2no2.pdf>
- Kishore, R., McMullen, M. R., Cocuzzi, E., & Nagy, L. E. (2004). Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comparative Hepatology*, 3 Suppl 1, S31. <http://doi.org/10.1186/1476-5926-2-S1-S31>
- Kolb, H., & Mandrup-Poulsen, T. (2010). The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia*, 53(1), 10–20. <http://doi.org/10.1007/s00125-009-1573-7>
- Kubo, M., & Motomura, Y. (2012). Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Frontiers in Immunology*, 3(AUG), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00275>
- Laugerette, F., Furet, J.-P., Debard, C., Daira, P., Loizon, E., Geloën, Michalski, M.-C. (2012). Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 302(3), E374–E386. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00314.2011>
- Lettner, A., & Roden, M. (2008). Ectopic fat and insulin resistance. *Current Diabetes Reports*, 8(3), 185-191.
- Li, L and Renier G. (2007) Adypocyte- derived lipoprotein lipase induces macrophage activation and monocyte activation: role of fatty acids. *Obesity*. 15(11): 2595-604
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 3–11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.63>
- Liu, L., Mei, M., Yang, S., & Li, Q. (2014). Roles of Chronic Low-Grade Inflammation in the Development of Ectopic Fact Deposition. *Hindawi Publishing Corporation: Mediators of Inflammation*, 1-7.

- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Buono, P. (2015). Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, 20, 17339-17361.
- Masaki, T., Chiba, S., Tatsukawa, H., Yasuda, T., Noguchi, H., Seike, M., & Yoshimatsu, H. (2004). Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, 40(1), 177–184. <http://doi.org/10.1002/hep.20282>
- Mihara, M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, & Shiina M. *et al.*, (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 122 (4) 143-159. <http://doi.org/10.1042/CS20110340>
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russel, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114, 999-1012.
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114(07), 999–1012. <http://doi.org/10.1017/S0007114515002093>
- N. Agnieszka, S. Marek, K. Irina, K. Agnieszka and G. Maria. (2007). "Plasma Interleukin-10 Concentration Is Positively Related to Insulin Sensitivity in Young Healthy Individuals." *Diabetes Care*, 28 (8), 1-10.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Neurath, M. F. and Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(2), 83-89. <http://doi:10.1016/j.cytogfr.2011.02.003>
- Odia, O.J., S. Ofori, and O. Maduka. (2015). Palm oil and the heart: A review. *World J Cardiol.* 7 (3), 144-9.

Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011) Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut health and immune function. *EFSA J* 9, 1984–1996.

Park, E. J., Lee, A. Y., Park, S., Kim, J. H., & Cho, M. H. (2014). Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 26–34. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.027>

Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2006). The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57(SUPPL. 10), 43–51.

QUIAGEN, website. http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway. Consultado en junio de 2016.

Reaven, G.M., Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988. 37 (12): p. 1595-1607.

Reddy, J. K., & Rao, M. S. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal Of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, G852–G858. <http://doi.org/10.1152/ajpgi.00521.2005>.

Rivas, F., Proaño, K., Jiménez, P., & León-Reyes, A. (2011). Análisis de la expresión del gen PR-1 , mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. *VI Congreso Ciencia Y Tecnología ESPE*, 11.

Sachithanandan, N., Graham, K. L., Galic, S., Honeyman, J. E., Fynch, S. L., Hewitt, K. A., ... Kay, T. W. (2011). Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 60(8), 2023–2031. <http://doi.org/10.2337/db11-0259>

- Sánchez N., J. C., López Z., D. F., Pinzón D., Ó. A., & Sepúlveda A., J. C. (2010). Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo. *Revista Colombiana de Cardiología*, 17(4), 167–176. [http://doi.org/10.1016/S0120-5633\(10\)70236-9](http://doi.org/10.1016/S0120-5633(10)70236-9)
- Sánchez-Muñoz, F., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F., & Cruz, M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta Médica de México*., 141(6), 505–512.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5), 878–888. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Tabas, I and Glass, C.K. (2013). Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. *Science*., 339. 166-172
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimeraza (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70.
- Tamura, T., Wada, S., Findlay, D. M., & Martin, T. J. (1995). Interleukin 10(EL,10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220.
- Taub, R. (2003). Hepatoprotection via the IL-6 / Stat3 pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 112(October), 978–980. <http://doi.org/10.1172/JCI200319974>.Acute
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5,836-847, <http://doi:10.1038/nrm1489>.
- Thaman, R., & Arora, G. (2013). Metabolic Syndrome: Definition and Pathophysiology – the discussion goes on! *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, 3(3), 48. <http://doi.org/10.5455/jppa.20130317071355>

- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836–1846. <http://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Unger, R., Clark, G., Scherer, P., & Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3), 209-214.
- Vonghia, L., Magrone, T., Verrijken, A., Michielsen, P., Van Gaal, L., Jirillo, E., & Francque, S. (2015). Peripheral and Hepatic Vein Cytokine Levels in Correlation with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-Related Metabolic, Histological, and Haemodynamic Features. *PloS One*, 10(11), e0143380. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0143380>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808. <http://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Wongchana, W., & Palaga, T. (2012). Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cellular and Molecular Immunology*, 9(10), 155–162. <http://doi.org/10.1038/cmi.2011.36>
- Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(3), 249–258. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.08.004>
- Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Clemens, M., & Diehl, A. M. (1997). Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2557–62. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2557>
- Zahran, W. E., Salah El-Dien, K. a, Kamel, P. G., & El-Sawaby, A. S. (2013). Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic

Fatty Liver Disease Progression. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 28(2), 141–6. <http://doi.org/10.1007/s12291-012-0236-5>

Zahran, W. E., Salah El-Dien, K. a, Kamel, P. G., & El-Sawaby, A. S. (2013). Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 28(2), 141–6. <http://doi.org/10.1007/s12291-012-0236-5>

Zamboni, M., Rossi, A. P., Fantini, F., Budui, S. L., Zoico, E., Zamboni, G. A., (2014). Predictors of Ectopic Fat in Humans. *Curr Obes Rep*, 3(4), 404-413.

Zhou, B. R., Zhang, J. A., Zhang, Q., Permatasari, F., Xu, Y., Wu, D., Luo, D. (2013). Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokines interleukin-6, interleukin-1 β , and Tumor Necrosis Factor- α via a NF- κ B-dependent mechanism in HaCaT keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/530429>