



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Expresión transcripcional de las moléculas IL-13, IL-18 y Nrf2 en hígados 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 A

P R E S E N T A :

Yadira Nazaria Vazquez Hernández

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. SANTIAGO CRISTÓBAL SIGRIST FLORES



MARZO, 2019
CD.MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Por el financiamiento otorgado por DGAPA-PAPIIT-IN223113, utilizado para la elaboración de este proyecto.

Al M. en C. Santiago Cristóbal Sigrist Flores (*SANTY*), por aceptar ser mi asesor de tesis, por ser paciente sin dejar de ser una persona amable y comprensiva y por todas las enseñanzas aprendidas durante mi estancia en el laboratorio 7 de la Unidad de Morfología y Función.

“GRACIAS SANTY POR LA GRAN PERSONA QUE ERES CONMIGO, MI MAESTRO, UN COMPAÑERO DE TRABAJO Y MI AMIGO”

Al Dr. José Rafael Jiménez Flores, por el apoyo, por ser el primero en brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por siempre tener unas palabras de aliento en momentos difíciles, por las enseñanzas, por los buenos comentarios, y cada una de las palabras brindadas, incluso por aguantar mis ideas locas sobre festejar un cumpleaños o adornar para navidad.

“GRACIAS DOCTOR POR CREER EN MI”

Al Dr. Alberto Ponciano por su apoyo en la metodología y en los análisis de resultados para poder realizar mi tesis, gracias por los comentarios, por ser tan exigente y estricto.

“GRACIAS POR SER MÁS QUE UN SINODAL, GRACIAS POR SER UNA GRAN AMIGO”

A cada uno de mis compañeros por hacer que cada día de estancia en el laboratorio resultara ser divertido y de gran felicidad.

Dianis Reyes por tu gran amistad, por ser una buena consejera por ser una gran amiga “te quiero”.

Beto “Güero” por ser tan gracioso y tan amable en realidad eres un ser lleno de luz y alegría.

Gabriela e Iván mis amigos y compañeros de servicio social “*Que Buen Trabajo Hicimos Juntos*”, los extraño tanto!

Carmelita que sin su ayuda el laboratorio no sería mucho de lo que es, eres una gran mujer, tan dedicada, tan trabajadora.

“A TODOS MIS COMPAÑEROS AMIGOS Y COLEGAS, POR TANTOS MOMENTOS DE FELICIDAD, DE APOYO Y DE AMISTAD, MIL GRACIAS”

Gracias también a los conejitos que sin saberlo, dieron su vida y ayudaron a la realización de este trabajo.

Y en general le agradezco a todas esas grandes personas que han formado parte de mi vida, y que de alguna manera dejaron una gran huella en mi corazón.

“GRACIAS INFINITAMENTE A LA VIDA POR PONERME EN ESTE CAMINO”

DEDICATORIAS

A Mis Padres

Alejandro Vazquez y Blanca Estela Hernández.

Los pilares que me mantuvieron de pie durante toda mi trayectoria escolar, las personas que me criaron, me educaron y me dieron todos los valores que han hecho de mí un ser humano de provecho.

No tengo palabras para decirles cuanto los quiero y los amo. Quiero que sepan que siempre han sido mi ejemplo, los admiro y me siento orgullosa de ustedes, no pude haber tenido mejores padres. Recuerden que este proyecto y todo lo que soy es producto de su esfuerzo, yo solo fui el conducto por el cual se proyectó su amor y dedicación.

“LO LOGRAMOS”

A mi hermano Joel Alejandro.

Gracias por estar aquí, nunca te lo dije, pero eres como un hijo para mí. No creo ser un ejemplo para ti, y tampoco quiero serlo, solo espero que estés orgulloso de mi y quiero ser una motivación para que sepas que siempre se puede lograr lo que uno se propone, no importa cuánto tiempo tardes, lo importante siempre es continuar avanzando, recuerda que siempre voy a estar para ti. ¡Espero pronto puedas iniciar tu carrera!

“TE QUIERO HERMANO”

A mi esposo Marco Soto e Hij@.

Te agradezco infinitamente el apoyo que me has dado en todos los amitos, gracias ´por tu amor, tu cariño, tu paciencia, pero sobre todo por el esfuerzo que haces día con día para que nada nos falte a tu hij@ y a mí, eres el mejor y estoy orgullosa de ti. Gracias por todos estos años de aprendizaje juntos, por ser uno de los pilares más poderos que me sostienen, por seguir a mi lado en este camino y por creer en mí. Espero pronto compartir la misma felicidad contigo al verte graduado, recuerda ¡Mejores tiempos nos esperan!

“GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA Y PARTE DE ESTA HISTORIA, TE AMO”

Y sobre todo a este bebé que está en proceso de crecimiento, y que ahora forma parte de esta historia. Te agradezco el haber traído un rayito de luz a nuestras vidas, espero algún día te sientas orgullos@ de mí.

“TE AMO TANTO”

A mi Familia; Cuñis, Primos, Tíos y Abuelos.

A ellos que forman parte de mi vida, solo tengo mil agradecimientos, los quiero tanto, gracias por ser siempre tan lindos conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	7
INTRODUCCION	7
Síndrome metabólico	8
Obesidad y sobrepeso	10
Dieta.....	11
Tejido adiposo (TA).....	12
Lipotoxicidad	14
Hígado graso	16
Interleucina 13 (IL-13).....	19
Interleucina 18 (IL-18).....	19
Factor nuclear eritroide (Nrf2).....	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
Objetivo general	24
Objetivos particulares:.....	24
METODOLOGÍA.....	24
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	45
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXOS	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SM	Síndrome Metabólico
HDL	Colesterol De Alta Densidad
ECV	Enfermedad Cardiovascular
DM2	Diabetes Mellitus 2
IFD	Federación Internacional De Diabetes
OMS	Organización Mundial De La Salud
NCEP- ATP III	Programa De Educación Nacional Para El Colesterol; Panel De Expertos En La Detección, Evaluación Y Tratamiento De Los Niveles Altos De Colesterol En Adultos III
IMC	Índice De Masa Corporal
TA	Tejido Adiposo
ENSANUT MC	Encuesta Nacional De Salud Y Nutrición De Medio Camino
AGL	Ácidos Grasos Libres
AP	Acido Palmítico
TG	Triglicéridos
TAB	Tejido Adiposo Blanco
ERO	Especies Reactivas De Oxígeno
CTE	Cadena De Transporte De Electrones
EH	Esteatosis Hepática
HGNA	Hígado Graso No Alcohólico
EO	Estrés Oxidativo
IL-18	Interleucina 18
IL-13	Interleucina 13
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad son componentes del diagnóstico de síndrome metabólico que afectan principalmente al tejido adiposo, debido al desequilibrio energético que provocan las dietas ricas en lípidos se estimula el almacenamiento excesivo de triglicéridos en los adipocitos, que junto con el incremento de ácidos grasos libres favorece la acumulación de lípidos de forma ectópica en otros órganos como el hígado (hígado graso no alcohólico), y al mismo tiempo provoca estrés oxidativo.

El consumo de dietas ricas en grasas saturadas, se considera tienen efectos potencialmente perjudiciales para la salud, especialmente el ácido palmítico, utilizado en la industria alimenticia, y que en la actualidad se considera un ácido graso pro-inflamatorio, ha sido relacionado con los diferentes componentes del síndrome metabólico.

El presente trabajo evaluó mediante la actividad transcripcional de algunos marcadores moleculares, los efectos de la ingesta crónica y moderada de ácido palmítico. Mediante Q-rtPCR se evaluó la expresión de tres moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio y de estrés oxidativo: IL-13, IL-18 y Nrf2 en hígados de conejo alimentados con una dieta enriquecida con 3 % de ácido palmítico durante 6 y 12 meses. Se observó que la dieta administrada por 6 meses promueve la sobre expresión de IL-13 (propiedades anti-inflamatorias), IL-18 (citosina con propiedades de regulación metabólica), y Nrf2 (citosina reguladora de estrés oxidativo), mientras a los 12 meses de tratamiento la expresión de IL-13 se mantiene, y la expresión de IL-18 y Nrf2 disminuye, demostrando que el consumo crónico moderado de ácido palmítico induce la sobreexpresión de IL-18 y Nrf-2 moléculas que están relacionadas con el proceso inflamatorio y estrés oxidativo, fenómeno acompañado con la sobreexpresión de IL-13 posiblemente como un mecanismo regulador.

Palabras clave: Obesidad, inflamacion, estrés oxidativo, IL-13, IL-18, Nrf2.

INTRODUCCION

Síndrome metabólico

A principio de los 80s Reaven propuso que el síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X, correspondía a una serie de factores metabólicamente interrelacionados (Crepaldi and Maggi 2006; Medica Del *et al.* 2008), desde entonces distintas organizaciones han buscado definir y unificar los criterios para diagnosticar lo que ahora conocemos como Síndrome metabólico (SM), ayudados de parámetros bioquímicos y antropométricos (Contreras-Leal and Santiago-García 2011).

El síndrome metabólico es una combinación de alteraciones metabólicas, asociadas con la resistencia a la insulina, que incluyen hipertensión, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, bajo HDL y obesidad (Alberti *et al.* 2009; Madrigal 2008; Wesley and Supiicy 2009), alteraciones que representan un riesgo para la salud, y en conjunto estimulan el desarrollo de otras enfermedades o bien, pueden complicarlas (Pajuelo and Sánchez 2007). En la actualidad el SM es una entidad propuesta para evaluar el riesgo de Enfermedad cardiovascular (ECV) y Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Murguia-Romero *et al.* 2015), y su diagnóstico clínico va a depender de la definición del grupo experto con la que se quiera trabajar ya que las organizaciones proporcionan criterios ligeramente diferentes (**Tabla 1**) (Alberti *et al.* 2009).

El incremento en la frecuencia del SM es un fenómeno mundial, y en México es uno de los problemas de salud más importantes (Aguilar-Salinas *et al.* 2004). La Federación Internacional de Diabetes (IFD, por sus siglas en inglés) estima que alrededor del 20-25% de la población mundial adulta esta diagnosticada con SM y tiene el doble de probabilidades de morir prematuramente, el triple de probabilidades de sufrir un ataque cardíaco o un derrame cerebral y un riesgo cinco veces mayor de desarrollar DM2, una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y la cuarta o quinta causa principal de muertes en el mundo (IDF, 2006).

Parámetros bioquímicos y antropométricos empleados para el diagnóstico del Síndrome Metabólico.

Factores	Criterios de la OMS	Criterios del NCEP-ATP III	Criterios de la IDF
Resistencia a la insulina	DM2, IG, GAA, Baja sensibilidad a la insulina RI	Ninguno, pero deben presentar al menos 3 de los siguientes 5 parámetros	Ninguno, pero se debe contar con 2 de las siguientes alteraciones
Glucosa	IG 126mg/dL (<7mmol/L) posteriores a la comida AGA 110mg/dL (≥6.1 mmol/L)..	≥110 mg/Dl en ayuno	Alterada en ayuno ≥110 mg/dL (5.6 mmol/L) o diagnóstico previo de DM2.
Obesidad	IMC >30kg/m ² y/o relación cintura cadera Hombres >0.9 Mujeres >0.85	Aumento de cintura > 102 cm hombres y > 88 cm mujeres.	Circunferencia de la cintura hombres ≥94 cm mujeres ≥80 cm
Lípidos	Triglicéridos en el plasma ≥150mg/dL (≥1.7mmol/L) HDL Hombres <35 mg/dL (<0.9 mmol/L) Mujeres <39 mg/dL (<1.0 mmol/L)	Triglicéridos ≥ 150 mg/dL (≥ 1.7 mmol/L) HDL Hombres <40 mg/ml, 1.03 mmol/L Mujeres <50 mg/dL, 1.29 mmol/L	Triglicéridos ≥150 mg/dL (≥1.7 mmol/L) HDL Hombres < 40 mg/ml, 1.03 mmol/L Mujeres <50 mg/dL, 1.29 mmol/L
Presión arterial	≥140/90 mm Hg	≥ 130/ ≥ 85 mm Hg	≥ 130 (sístole) / ≥ 85 (diástole) mm Hg

Tabla 1. OMS= Organización Mundial de la Salud; **NCEP-ATP III** = National Cholesterol Education Program– Panel de expertos en la detección, evaluación y tratamiento de los niveles altos de colesterol en adultos III; **IDF**= Federación Internacional de la Diabetes; **IMC**= Índice de Masa Corporal; **HDL-C** = Colesterol en lipoproteínas de alta densidad (Tomado y modificado de (Contreras-Leal and Santiago-García 2011).

Obesidad y sobrepeso

La obesidad y el sobrepeso se caracterizan por una acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo (TA), causado principalmente por un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las gastadas (OMS, 2015). Su clasificación se da en función al Índice de Masa Corporal (IMC), calculado como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros², de esta manera se puede decir que un IMC saludable esta entre 18.5 - 24.9 y un IMC en estado de obesidad es mayor o igual a 30.0 (Wyatt, Winters, and Dubbert 2006).

La obesidad y el sobrepeso son factores de riesgo importantes para el desarrollo de enfermedades degenerativas como: hipertensión arterial, diabetes y esteatohepatitis (Gomez-ambrosi *et al.* 2013). Se dice que factores genéticos, bioquímicos, malos hábitos alimenticios y el sedentarismo, son algunas de las causas principales que contribuyen a este desequilibrio lipídico (Acosta García 2011).

En las últimas décadas el sobrepeso y la obesidad han crecido de manera acelerada, alcanzando proporciones pandémicas, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo (Contreras-Leal and Santiago-García 2011). Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016), en México la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población adolescente (12–19 años) fue de 36.3 % de los encuestados, superior que en el 2012 (34.9 %), mientras que en adultos de 20 años o más, la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de 72.5 % con un ligero incremento en comparación al 2012 (71.2 %) (Shamah-Levi *et al.* 2016). Se cree que algunos de los factores principales que influyen en desarrollo de sobrepeso y obesidad durante el progreso de la etapa adolescente a la adulta, es el cambio de alimentación, la frecuencia con la que se ingieren alimentos ricos en grasas saturadas o carbohidratos fuera de casa, aunado al tamaño de las raciones, el periodo que transcurre entre los alimentos, y la falta de actividad física que provocan las largas jornadas de trabajo o estancia en la escuela (Garaulet *et al.* 2008).

Dieta

La causa principal del desarrollo de sobrepeso, obesidad, DM2 e HGNA, se asocia con mayor frecuencia a la ingesta de dietas hipercalóricas ricas en grasas saturadas, y aunque sabemos que los lípidos son macronutrientes esenciales en la dieta humana, la cantidad de lípidos que consumimos muchas veces rebasa lo recomendado y provoca un impacto negativo en la salud (Bree, Laitinen, and Flöter 2009; Mancini *et al.* 2015). Diferentes estudios relacionan estas dietas ricas en lípidos con el incremento del tejido adiposo, la elevación de AGL circundantes, la deposición ectópica de lípidos en hígado, alteraciones en la homeostasis del hígado y la inflamación crónica de bajo grado (Blancas-Flores, Almanza-Pérez, and López-Roa 2010; Joshi-Barve *et al.* 2007; Laugerette *et al.* 2018)

Los aceites vegetales representan las grasas más consumidas y las de mayor demandadas a nivel mundial. Dentro de estas fuentes vegetales, el aceite de palma ocupa el segundo lugar en producción a nivel mundial y el 90% de este es utilizado con fines alimenticios (Hernández *et al.* 2017; Mancini *et al.* 2015; Mora G *et al.* 2000). En las últimas décadas el uso del aceite de palma y sus refinados han ido creciendo exponencialmente en la industria alimenticia, y debido a sus propiedades organolépticas es utilizado para dar textura, fragancia y un sabor neutro a los productos terminados; por lo general encontradas en: mantecas, aceites, mayonesa, mantequilla, o en productos procesados como; caramelos, pasteles, papas fritas, chocolates, galletas, comidas congeladas como: pizza, papas, panques, helado, sopas instantáneas, palomitas para microondas, aderezos, suplementos, vitaminas; entre otros (Mancini *et al.* 2015).

Comparado con la mayoría de otros aceites vegetales, el aceite de palma contiene una gran cantidad de grasas saturadas (40-50% del total de grasa), la mayoría en forma de ácido palmítico (AP) un ácido graso saturado de dieciséis carbonos (16:0) de cadena lineal (**figura 1**) (Epidemiology *et al.* 2018), considerado como pro-inflamatorio, por su capacidad para activar las vías de señales de traducción ligadas a receptores tipo-Toll, en particular Toll-like receptor-2 y 4 (TLR-2 y TLR-4) que conduce a la activación de la respuesta inflamatoria a través de NF-kB,

especialmente en macrófagos residentes que conforman el tejido adiposo (Ramirez *et al.* 2016).

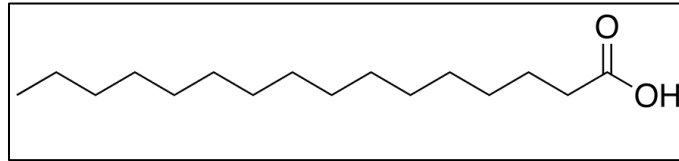


Figura 1. **Ácido Palmítico**; ácido graso compuesto de 16 carbonos.

Tejido adiposo (TA)

El tejido adiposo se reconoce actualmente como un órgano multifuncional, uno de sus principales papeles es el almacenamiento de lípidos en forma de triglicéridos (TG) dentro de las células adiposas y durante el consumo de energía, participa también en la liberación de AG cuando el gasto de energía excede el consumo de energía y en la catálisis de TG para la liberación de glicerol y AG que participan en la gluconeogénesis en hígado y otros tejidos; procesos denominados lipólisis y lipogénesis (Bastarrachea *et al.* 2005; Contreras-Leal and Santiago-García 2011; Hita *et al.* 2002; Vázquez-Vela, Torres, and Tovar 2008).

Además de almacenar energía, el TA y más específicamente el adipocito es considerado como una glándula endocrina, que secreta sustancias bioactivas denominadas adipocinas, que ejercen una profunda influencia en los fenómenos proinflamatorios y protrombóticos, que desencadenan el proceso ateromatoso y la DM2, además de controlar diversas funciones relacionadas con el metabolismo de células ubicadas en el cerebro, hígado, músculo o páncreas (Bastarrachea *et al.* 2005; Kershaw and Flier 2004).

El TA se distribuye en distintos sitios del organismo y no solo presenta diferencias en la ubicación, sino también en su morfología y fisiología (**figura 2**) (Marcano *et al.* 2006; Suárez Carmona, Sánchez Oliver, and González Jurado 2017). Está compuesto principalmente por adipocitos (células adiposas) esféricos, grandes y fuertemente empaquetados, apoyados por un tejido conectivo suelto rico en vascularización, su tamaño varía en relación con el contenido lipídico de la célula, aproximadamente de 30-130 μm de diámetro (promoviendo los procesos de

hipertrofia e hiperplasia), su volumen es un factor determinante de la funcionalidad de la célula, adipocitos más grandes generalmente exhiben una mayor actividad metabólica y secretan más quimosinas para células inmunitarias (Flores-Lázaro and Rodríguez-Martínez 2011; Wronska and Kmiec 2012).

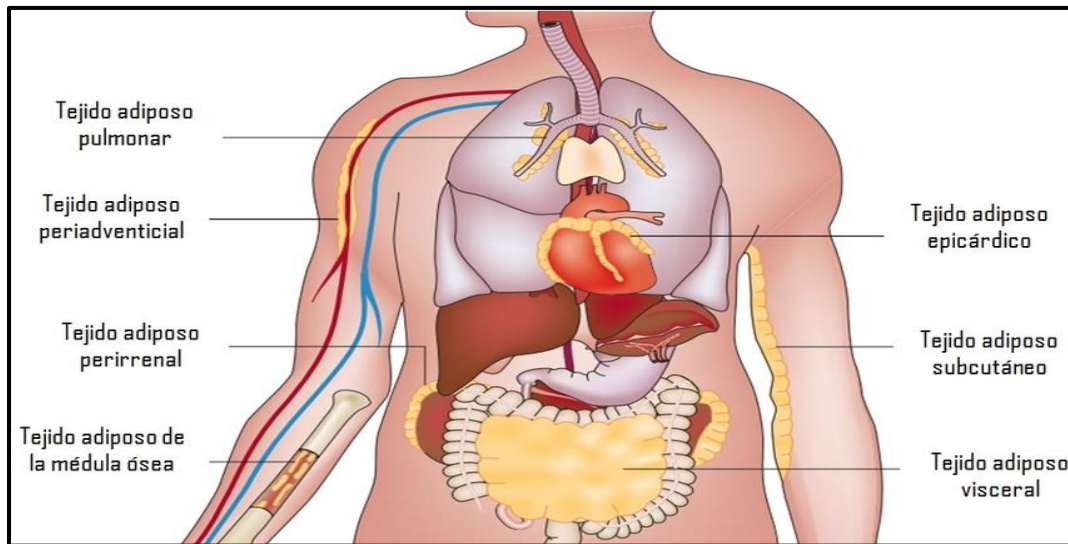


Figura 2. Diferentes depósitos grasos del tejido adiposo. Tomado de (Suárez Carmona, Sánchez Oliver, and González Jurado 2017). El tejido adiposo se encuentra principalmente en depósitos subcutáneos y viscerales, pero en condiciones de obesidad, el tejido adiposo se deposita de manera ectópica en otros órganos como el corazón, los riñones y los vasos sanguíneos. Además la secreción diferencial de adipocinas por diversos depósitos de tejido adiposo puede afectar selectivamente la función del órgano y el metabolismo sistémico.

Entre las funciones más importantes del TA, destaca la producción de leptina, hormona que informa al cerebro del estado nutricional del individuo para controlar la ingesta, así como la distribución de energía a otros tejidos en los periodos de digestión (Moreno and Martínez 2002), por lo que el tejido adiposo tiene una influencia importante en los procesos fisiológicos, como la homeostasis, además, los adipocitos participan activamente en procesos metabólicos como la angiogénesis, la adipogénesis, la disolución y transformación de la matriz extracelular, el metabolismo de los esteroides, la respuesta inmune y la homeostasis del hígado, páncreas y músculo (**figura 3**) (Esteve Ràfols 2014; Vázquez-Vela, Torres, and Tovar 2008). Por lo tanto, al perturbar la fisiología de

este tejido se provocan alteraciones metabólicas, que en condiciones como la obesidad causa la acumulación ectópica de lípidos y contribuye en la patogenia de resistencia a la insulina en músculo e hígado, además favorece la esteatosis hepática por un proceso denominado lipotoxicidad (Izquierdo and Medina-Gómez 2012).

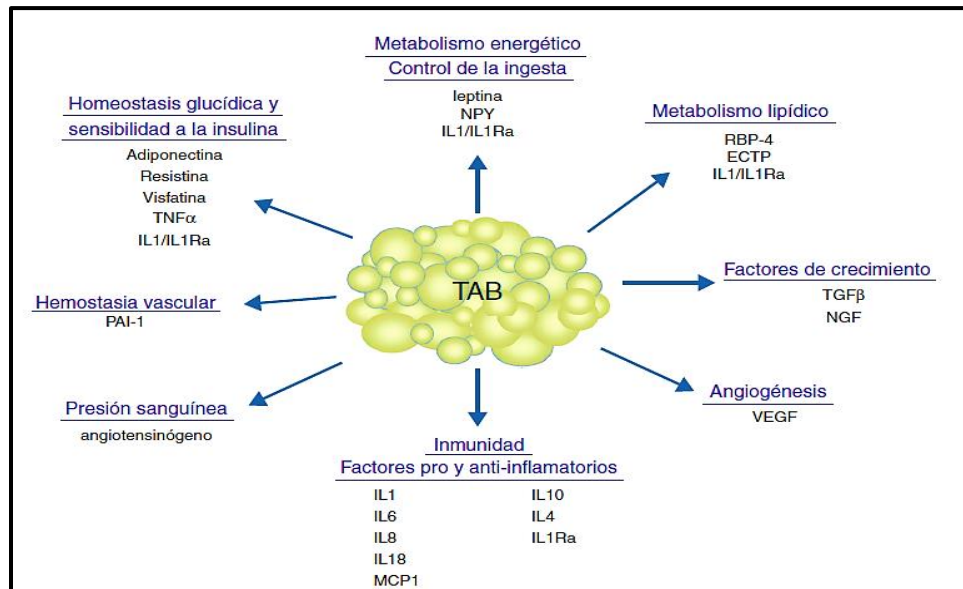


Figura 3. Procesos fisiológicos y metabólicos regulados por el TAB. Un órgano dinámico que sintetiza y secreta numerosos factores, no solo lipídicos sino también proteicos, que intervienen en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y metabólicos Tomado de (Esteve Ràfols 2014).

Lipotoxicidad

La lipotoxicidad se define como la toxicidad celular observada en presencia de una acumulación anormal de lípidos, es decir; la acumulación de lípidos en tejido no adiposo, condición que estimula la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el hígado debido a la estimulación excesiva de la β -oxidación y a la constante liberación de electrones por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE) (Manuscript and Disease 2010; Zábó et al. 2013). El término lipotoxicidad hace referencia a los efectos deletéreos del exceso de los ácidos grasos (AG) y la acumulación de la grasa ectópica que provoca muerte celular o

disfunción orgánica (Martínez and Torres 2013). En el sobrepeso y obesidad, el consumo excesivo de alimentos ricos en lípidos, combinado con el aumento en la liberación de AG por parte del TA (debido a la incapacidad de los adipocitos de almacenar los excesos de AG en forma de TG) y la elevación de AGL, favorecen la lipotoxicidad y el depósito ectópico de estos lípidos en tejidos no adaptados para almacenar grandes cantidades de TG (esteatosis) **(figura 4)** (Contreras-Leal and Santiago-García 2011).

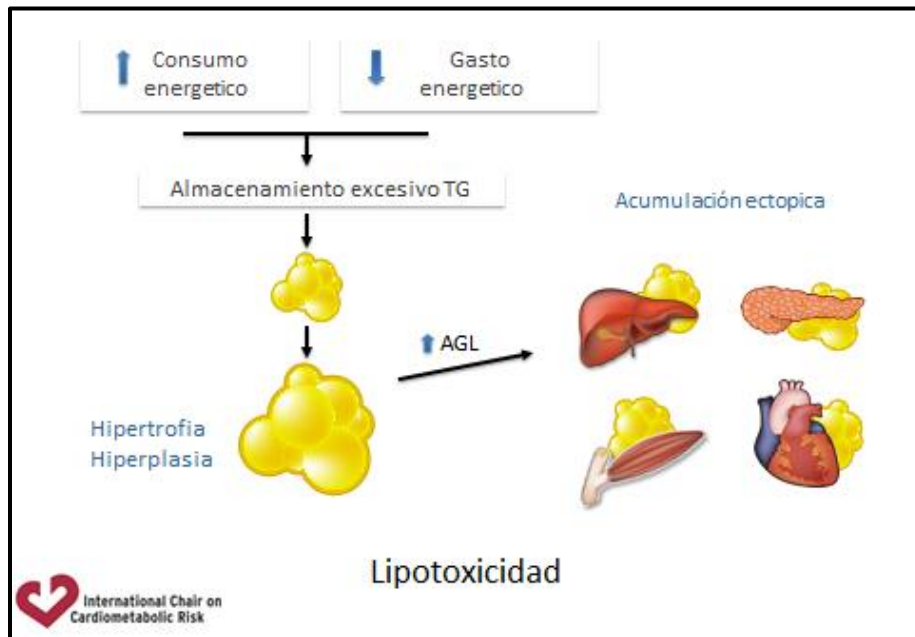


Figura 4. Esquema general de Lipotoxicidad ectópica. Tomada y modificada de la (International Chair on Cardiometabolic Risk). El consumo energético excesivo combinado con el gasto mínimo de energía, conduce al almacenamiento excesivo de triglicéridos (TG) en los adipocitos, provoca la hipertrofia e hiperplasia de estos, desencadena la circulación ácidos grasos libres e induce al depósito ectópico de lípidos en órganos como páncreas, corazón, músculos e hígado, provocando el fenómeno denominado lipotoxicidad.

Es importante enfatizar que no solo la acumulación excesiva de TG es dañina, pero sí se considera uno de los factores detonantes la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), moléculas promotoras de inflamación y alteraciones en la función de otros tejidos. (Cusi 2009).

Hígado graso

El hígado es el órgano encargado del metabolismo de lípidos y se ve afectado principalmente por el exceso de lípidos en las dietas (Milić, Lulić, and Štimac 2014). Como consecuencia se desarrolla esteatosis hepática (EH), que es la fase inicial de la entidad denominada hígado graso no alcohólico (HGNA), y se define como la acumulación anormal de vacuolas de grasa en los hepatocitos (Camacho et al. 2009) en pacientes sin un consumo tóxico de alcohol (Caballería et al. 2008). La infiltración grasa del hígado surge como respuesta a gran variedad de estímulos nocivos que incluyen hipoxia, toxinas, inflamación sistémica, neoplasias malignas, ayuno, deficiencias nutricionales, y diversas alteraciones metabólicas, además de que la infiltración grasa puede participar en la progresión de fibrosis hacia cirrosis y la falla hepática (Méndez-Sánchez, Chávez-Tapia, and Uribe 2004) (Méndez-Sánchez, Chávez-Tapia, and Uribe 2004).

La EH es la alteración metabólica más frecuente a nivel hepático, la cual resulta del desequilibrio entre la síntesis y la liberación de triglicéridos. Se clasifica de acuerdo a la cantidad de hepatocitos infiltrados, se dice que es leve, cuando menos del 25 % de los hepatocitos muestran infiltración grasa, moderada del 25–50 % y severa cuando hay más del 50 % de hepatocitos con infiltración (Camacho et al. 2009). Además se distinguen dos categorías morfológicas, la EH macrovesicular, traducido como un daño crónico, donde el citoplasma está ocupado por una gran vacuola, que desplaza al núcleo hacia la periferia, y la microvesicular, que trata de un daño celular agudo, donde aparecen múltiples vacuolas pequeñas intracitoplasmáticas sin desplazamiento del núcleo (Santos et al. 2010). Cuando además de la acumulación grasa hay inflamación hepática y grados variables de fibrosis, se denomina HGNA, patología que puede progresar a cirrosis y eventualmente a carcinoma hepatocelular (Camacho et al. 2009).

La obesidad es una de las principales alteraciones que afectan al hígado, ya que favorece la lipotoxicidad hepática, que induce al desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica (Hígado graso), esteatohepatitis y cirrosis hepática (Soca and Peña 2009), padecimiento que a la vez favorece el desarrollo de alteraciones en la respuesta inmunitaria, como lo es el proceso inflamatorio (crónico o de bajo grado

de intensidad) (**figura 5**) (Blancas-Flores, Almanza-Pérez, and López-Roa 2010), así como el desencadenamiento de estrés oxidativo (Martínez-abundis, Sánchez-rodríguez, and Hafidi-bentlakder 2005).

En este sentido, la acumulación excesiva de triglicéridos en el hepatocito deteriora la capacidad oxidativa de las mitocondrias, aumentando el estado reducido de los complejos de la CTE y estimulando las vías peroxisomal y microsomal de la oxidación de las grasas, que causan estrés oxidativo (EO) y muerte celular (Rolo, Teodoro, and Palmeira 2012), y con ello la liberación de ERO que pueden causar daños directos o indirectos en diferentes órganos (Bautista *et al.* 2011). Además el EO también desencadena la producción de citosinas inflamatorias, que causan inflamación y una respuesta fibrogénica. Este es el resultado del desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que puede provocar una enfermedad hepática en etapa terminal (**figura 5**) (Rolo, Teodoro, and Palmeira 2012).

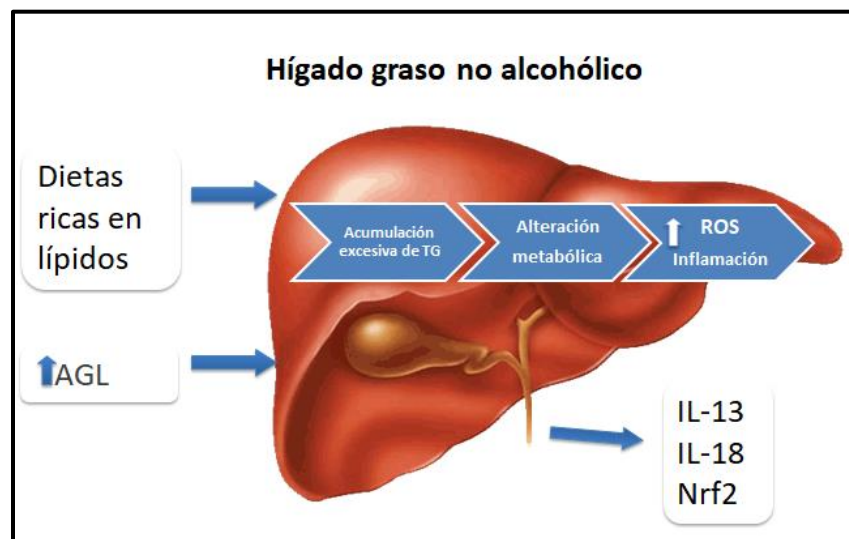


Figura 5. Hígado graso no alcohólico. Esquema general de las alteraciones que sufre el hígado a causa de las dietas ricas en lípidos.

El consumo de dietas altas en grasa puede alterar el metabolismo del oxígeno ya que los depósitos de grasa son vulnerables a sufrir reacciones de oxidación. Si la producción de ERO excede la capacidad antioxidante de la célula, el EO que produce la peroxidación lipídica podría contribuir al desarrollo de la aterosclerosis

y la activación de vías inflamatorias (Bautista *et al.* 2011; Xavier *et al.* 2016), fenómeno que en el hígado graso está relacionado con el aumento de adiposidad por ser un factor que desencadena alteraciones inmunitarias como el proceso de inflamación de bajo grado (Stanton *et al.* 2011).

El fenómeno inflamatorio es un mecanismo de defensa normal que protege al organismo de infecciones, lesiones, toxinas, alérgenos y otros daños: inicia por la destrucción de patógenos, la reparación del tejido y ayuda a restaurar la homeostasis en sitios infectados o dañados, procesos que pueden llegar a ser perjudiciales si adquieren carácter crónico (Zulet *et al.* 2007).

Antiguamente y de manera macroscópica este proceso se caracterizaba por la presencia de: enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de función (Calder *et al.* 2018; Rosado-pérez and Mendoza-núñez 2007), su autorregulación implica la activación de mecanismos de retroalimentación negativa tales como la secreción de citocinas antiinflamatorias, la inhibición de las cascadas de señalización proinflamatoria, la eliminación de receptores para mediadores inflamatorios y la activación de células reguladoras, factores esenciales para mantener la homeostasis, es decir, el fenómeno inflamatorio agudo es caracterizado por la síntesis y liberación de una gran cantidad de moléculas (citocinas, quimiocinas, aminas vasoactivas, etc.) que controlan la infección o daño, por otro lado la inflamación crónica provocada por las dietas hipercalóricas, presenta un curso prolongado (que se puede llevar de meses a años) y consiste en la liberación de citocinas, fenómeno donde se puede presentar destrucción tisular y reparación (ambos asintomáticos), donde los tejidos se ven infiltrados por linfocitos y macrófagos (Calder *et al.* 2018).

El proceso inflamatorio está mediado fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas (proteínas o glucoproteínas) de bajo peso molecular (< 30 kD) con vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, así como, también por determinadas células de otros tejidos, y son mediadores fundamentales de la transmisión de señales intercelulares (Sánchez-Ramón, López-Longo, and Carreño 2010). Dentro del

fenómeno antes mencionado de inflamación crónica, esta puede presentarse como inflamación crónica de bajo grado existe una gran cantidad de mediadores inflamatorios que podrían servir como indicadores de este tipo de inflamación, entre estas moléculas se encuentran IL-13, IL-18 y Nrf2.

Interleucina 13 (IL-13)

IL-13 es una citocina de regulación de la respuesta inmune y ha mostrado muchas similitudes con IL-4 (Schmid-Grendelmeier *et al.* 2002). Se trata de una citocina antiinflamatoria producida principalmente por células-T-CD4, actúa en linfocitos –B y monocitos, inhibiendo la producción de óxido nítrico y varias citocinas, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , entre otras (de Oliveira *et al.* 2011).

La IL-13 humana es una proteína no glicosilada de 132 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 10 kDa, presenta un 66 % de la homología en la secuencia de aminoácidos con la proteína P600 o IL-13 murina. Su gen se encuentra ubicado en el cromosoma 5q23-31 del humano y en el cromosoma 11 de ratón, en una región común a los genes que codifican para un grupo de factores de crecimiento, inmunorreguladores y hematopoyéticos. La función de IL-13 sola o en combinación con otras citocinas como la IL-4, IFN y/o la IL-10 sobre los monocitos humanos es inducir cambios significativos en el fenotipo y función de las células y potenciar la expresión de CD11b, CD11c, CD18, CD29 y VLA-5, miembros de la superfamilia de las integrinas (Vargas 1995), moléculas pro adhesivas para la migración de neutrófilos y linfocitos T, que participan en su adhesión al endotelio en lugares donde hay inflamación (Vergara CI, Martínez BM 1994).

Interleucina 18 (IL-18)

Una de las funciones primarias de la citocina es iniciar respuestas inmunes, sin embargo, cada vez es más evidente que juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, lo que los implica en la etiología de la enfermedad metabólica (Murphy *et al.* 2016; Zorrilla *et al.* 2007).

La interleucina 18 (IL-18) tiene un peso molecular de 18 kDa, fue descubierta por sus propiedades proinflamatorias, polarización de células-T, y propiedades

inductores de IFN, comparte similitudes con IL-13 pero actúa a través de su propio complejo receptor de IL-18, un miembro de la superfamilia de receptores similares a IL-1/Toll-like. Al igual que IL-1, IL-18 es un polipéptido multifuncional con funciones en la aterosclerosis y la lesión por isquemia en miocardio (Zorrilla *et al.* 2007).

En humanos IL-18 se correlaciona directamente con el IMC, adiposidad, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia y síndrome metabólico, consistente con los hallazgos de que la obesidad y el SM están acompañados por un estado de inflamación crónica de bajo grado. Actualmente se dice que IL-18 es un regulador homeostático que se opone al exceso de balance positivo de energía, donde la elevación de IL-18 en la obesidad refleja una compensación (inadecuada) análoga a lo que ocurre con la leptina. (Netea *et al.* 2006).

En humanos las concentraciones de IL-18 están aumentadas en individuos con diabetes mellitus tipo 2, en individuos obesos y en individuos con síndrome de ovario poliquístico. En ratones knockout para el receptor de IL-18 (IL18 - / -) e IL-18 (IL18r1 - / -), se ha observado un peso notablemente aumentado en comparación con el tipo silvestre de la misma edad, además de que en ausencia de IL-18 los ratones desarrollan varias características del SM: obesidad, resistencia a la insulina, hiperglucemia, anomalías lipídicas y aterosclerosis (Murphy *et al.* 2016; Netea *et al.* 2006).

Factor nuclear eritroide (Nrf2)

Nrf2 es un factor de transcripción que regula el estado redox celular, es controlado a través de una compleja red transcripcional/epigenética y postraduccional ya que su actividad aumenta durante la perturbación redox, la inflamación, la estimulación del factor de crecimiento y los flujos de nutrientes/energía, permitiendo así que el factor orqueste respuestas adaptativas a diversas formas de estrés. Además de mediar en la inducción de genes antioxidantes y desintoxicantes estimulados por el estrés, Nrf2 también regula positivamente la reparación y degradación de las macromoléculas dañadas y modula el metabolismo intermedio, inhibe la lipogénesis, favorece la β -oxidación de ácidos grasos, facilita el flujo a través de la vía de la pentosa fosfato y aumenta la regeneración de NADPH y la biosíntesis de

purinas, además de que puede dirigir la reprogramación metabólica durante el estrés (Hayes and Dinkova-Kostova 2014).

Recientes estudios en biología celular y molecular han mostrado que el Nrf2 tiene un rol importante en la adipogénesis y en la protección contra el SM en obesidad, además se considera un regulador maestro de la respuesta celular adaptativa al estrés oxidativo, y al mismo tiempo juega un rol muy importante en el proceso anti-inflamatorio (Ramirez *et al.* 2016).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el consumo de productos industrializados enriquecidos con ácido palmítico ha ido incrementando, y con ello el desarrollo de alteraciones metabólicas, en este sentido las dietas ricas en lípidos en conjunto con el sedentarismo son algunos de las principales factores que llevan a la población a desarrollar sobrepeso y obesidad, condiciones que inducen el desarrollo de enfermedades como la DM2, HGNA o inflamación de bajo grado.

Por lo tanto la elaboración de un modelo experimental, donde el consumo de AP sea bajo y de manera crónica nos permitirá evaluar las alteraciones tempranas relacionadas por el consumo de este lípido.

HIPÓTESIS

Al alimentar conejos con una dieta adicionada con 3 % de ácido palmítico se modificará la expresión hepática de las moléculas IL-13, IL-18 y Nrf2 a los 6 y 12 meses de tratamiento, moléculas relacionadas con un fenómeno inflamatorio y estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la expresión del RNA mensajero de IL-13, IL-18 y Nrf2 en hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) alimentados con una dieta adicionada con 3 % de ácido palmítico.

Objetivos particulares:

- Analizar mediante Q-rtPCR la expresión del RNAm de IL-13, IL-18 y Nrf2 en hígados de conejo tratados durante 6 y 12 meses con una dieta adicionada en ácido palmítico.
- Comparar la expresión de RNAm de IL-13, IL-18 y Nrf2 entre grupos, los tratados con la dieta de 3 % de ácido palmítico y los controles.
- Comparar la expresión de RNAm de IL-13, IL-18 y Nrf2 entre los tiempos de experimentación 6 y 12 meses.

METODOLOGÍA

Grupos y tratamientos

Se trabajó con 24 hígados de conejos machos de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus* NZW), provenientes de una granja de Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los conejos fueron seleccionados a los 30 días de nacidos con un peso aproximado de 300 ± 30 gr, se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo las siguientes condiciones; a una temperatura de 23-28 °C en ciclos de 12 h luz - 12 h oscuridad, con su respectivo alimento y agua a placer.

Los organismos se distribuyeron de manera aleatoria (n=6), de la siguiente forma:

Duración del tratamiento	Nombre del grupo	Tratamiento
6 meses	Control (CN)	Conejina
	Grasa (FAT)	Conejina + 3 % ácido palmítico
12 meses	Control (CN)	Conejina
	Grasa (FAT)	Conejina + 3 % ácido palmítico

Después del tiempo transcurrido con las dietas (6 y 12 meses), los organismos fueron sacrificados por una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (63mg/2.5kg de peso), para extirpar el hígado y congelarlo con nitrógeno líquido para su conservación a -70 °C para su posterior utilización.

Previo a la anestesia general, por punción de la vena marginal de la oreja se les extrajo una muestra sanguínea, se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm por 10 min., a los sueros obtenidos se les realizó la cuantificación de glucosa, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos, así como cuantificación de las enzimas hepáticas: aspartato transferasa (AST), alanino transferasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP), estas valoraciones fueron realizadas por un laboratorio de referencia internacional (CARPERMOR, S.A. de C.V.).

Corte y tinción histológica

Las muestras de hígado se lavaron con PBS 1X 3 veces y se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se procesaron por la técnica histológica de rutina y se incluyeron en bloques de parafina. La evaluación histológica se realizó en cortes de 5 µm. A todas las muestras se les realizó la tinción de H y E (**anexo 1**), con el fin de observar la histología general de los órganos e identificar posibles cambios.

Síntesis y Validación de Oligonucleótidos

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para el RNAm de cada una de las moléculas evaluadas. La secuencia de los genes de IL-13, IL-18, Nrf2 y el gen constitutivo GAPDH, se buscaron en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La confirmación del funcionamiento teórico de los oligonucleótidos, su especificidad y la longitud del producto, se realizó con el algoritmo *PICKPRIMERS*, en la siguiente página (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Extracción de RNA

Mediante en protocolo con fenol ácido y buffer AE (**anexo 2**), se realizó la extracción RNA partiendo de aproximadamente 1 cm³ de cada uno de los 12 hígados, es decir; 3 organismos de cada grupo experimental.

Se midió la concentración de RNA obtenido, por espectrofotometría, con una longitud de onda de 260 nm, aplicando la siguiente fórmula:

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

Donde (**abs**) = absorbancia; (**fac. dil**) = factor de dilución en el que se encontraba la muestra; y (**cte**) = constante equivalente para RNA con valor de (0.040).

Transcripción reversa (Síntesis de cDNA)

Se llevó a cabo una síntesis de la copia complementaria del DNA (cDNA) a partir de 2 μ G de RNA y mediante una transcripción reversa (rtPCR) con el kit, SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix, **(anexo 3)** atendiendo las instrucciones del proveedor.

PCR punto final

Para validar la correcta síntesis de cDNA de los grupos experimentales se realizaron reacciones de PCR punto final (Biotecmol amplificasa TAQ POLIMERASA) mediante la amplificación del gen constitutivo GAPDH **(anexo 4)**.

La validación del diseño correcto de los *primers* IL-13, IL-18 y Nrf2, se comprobó en un modelo experimental de inflamación aguda. Este diseño experimental se realizó utilizando un conejo adulto de 2 kg al cual se le aplicó por vía endovenosa 0.2 mgs de lipopolisacárido (LPS) (Masaki *et al.* 2004). Este organismo fue sacrificado 6 horas después del reto con LPS para extirpar el hígado y realizar extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR punto final con diferentes temperaturas de alineación: 62° C (IL-13), 57° C (IL-18), 62° C (Nrf2), y para el gen constitutivo 62° C (GAPDH). Para observar los resultados de la PCR se hicieron migraciones electroforéticas en geles de agarosa al 2.5 % **(anexo 5)**, utilizando un marcador molecular (Gene ruler) de 50 pb.

qPCR tiempo real

Con el cDNA obtenido, se realizaron reacciones por triplicado en qPCR tiempo real (qPCR- quantitative, por sus siglas en inglés) **(anexo 6)**.

Antes de procesar las muestras experimentales se elaboraron curvas de disociación desde los 60° C hasta los 95° C a intervalos de 3° C, con la intención de corroborar la presencia de un solo amplicon.

De igual manera se realizó un análisis de expresión génica relativa con los valores de Ct obtenidos de cada uno de los genes, incluyendo GAPDH (gen constitutivo) mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análisis estadístico

Los datos de $\Delta\Delta Ct$ se introdujeron en el programa GraphPad Prisma 6.0 para analizar la expresión relativa de los genes mediante el estadístico ANOVA de una cola y la prueba de T; el valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

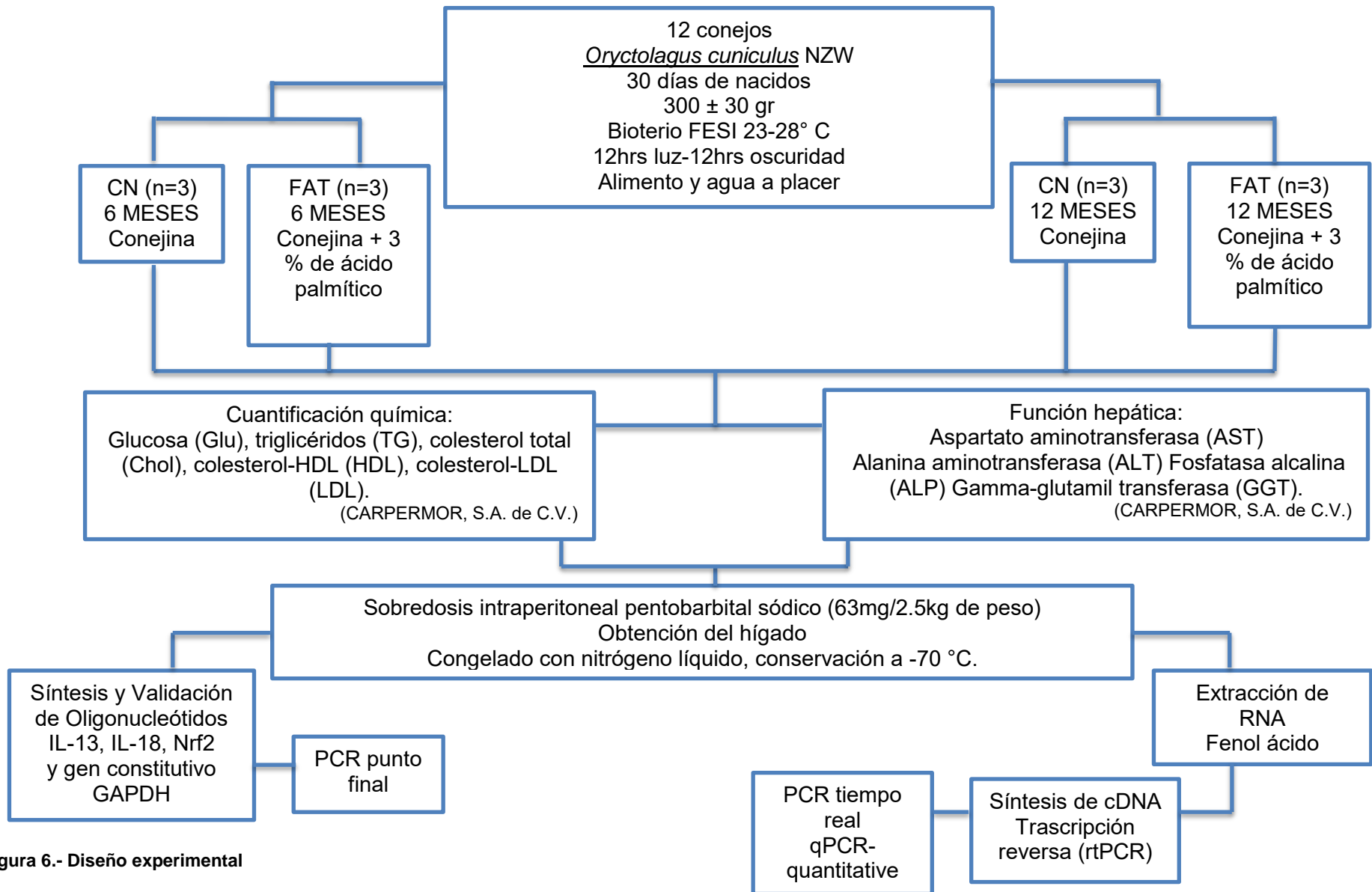
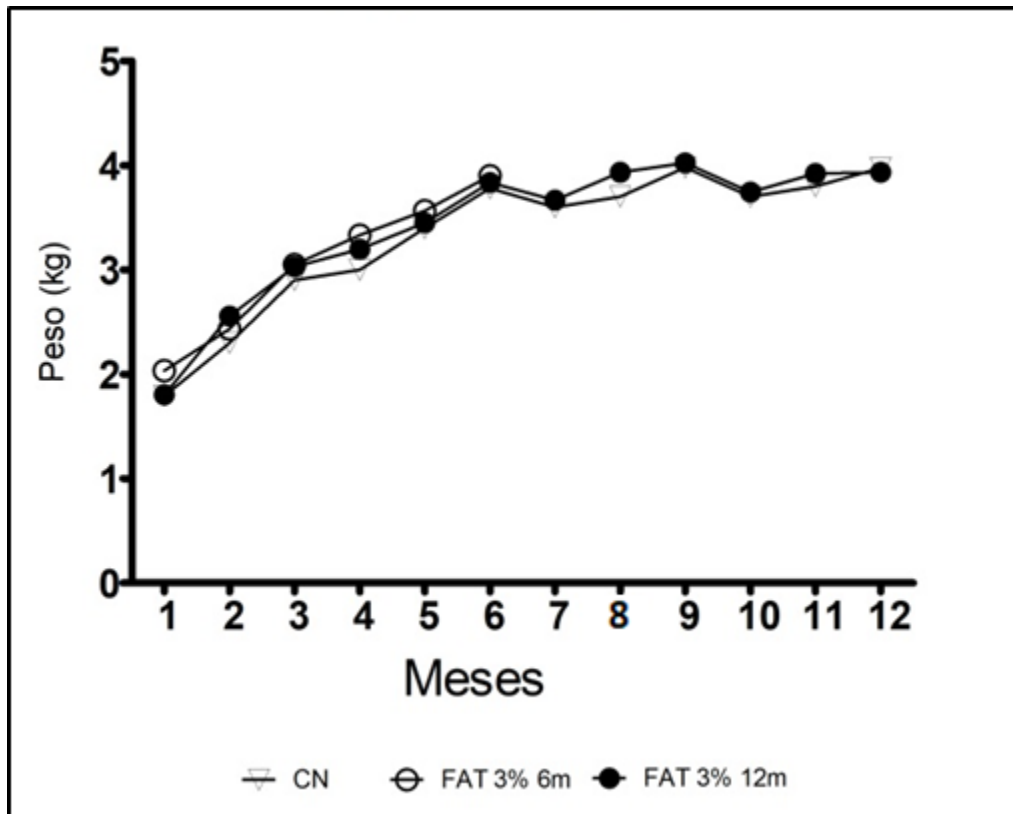


Figura 6.- Diseño experimental

RESULTADOS

Peso

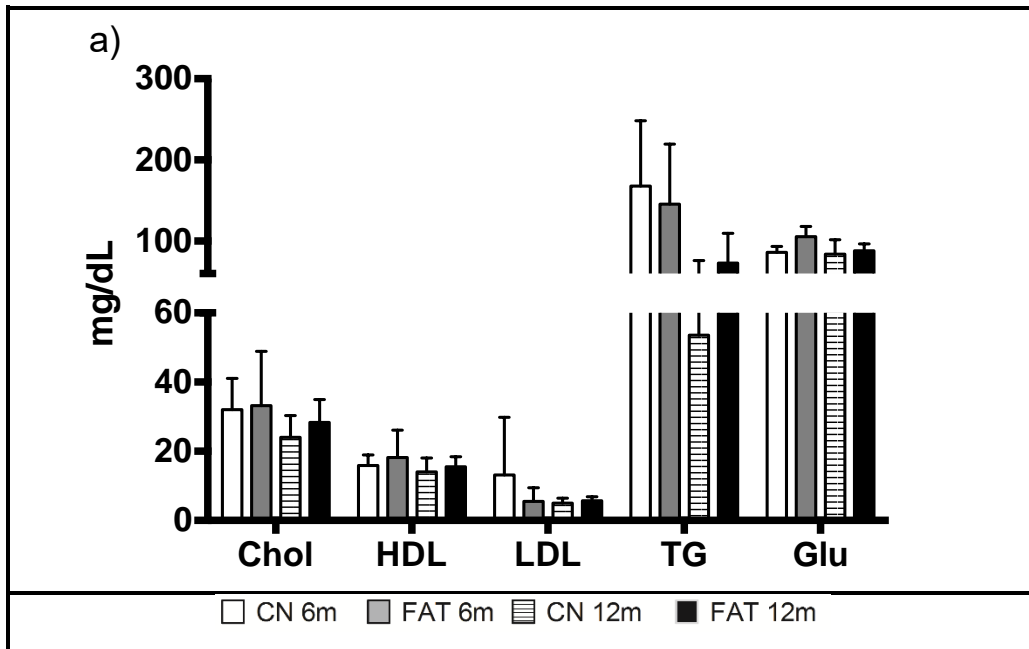
El seguimiento mensual del peso de los organismos con los diferentes tratamientos se muestra en la gráfica 1, donde no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre grupos (**Gráfica 1**).



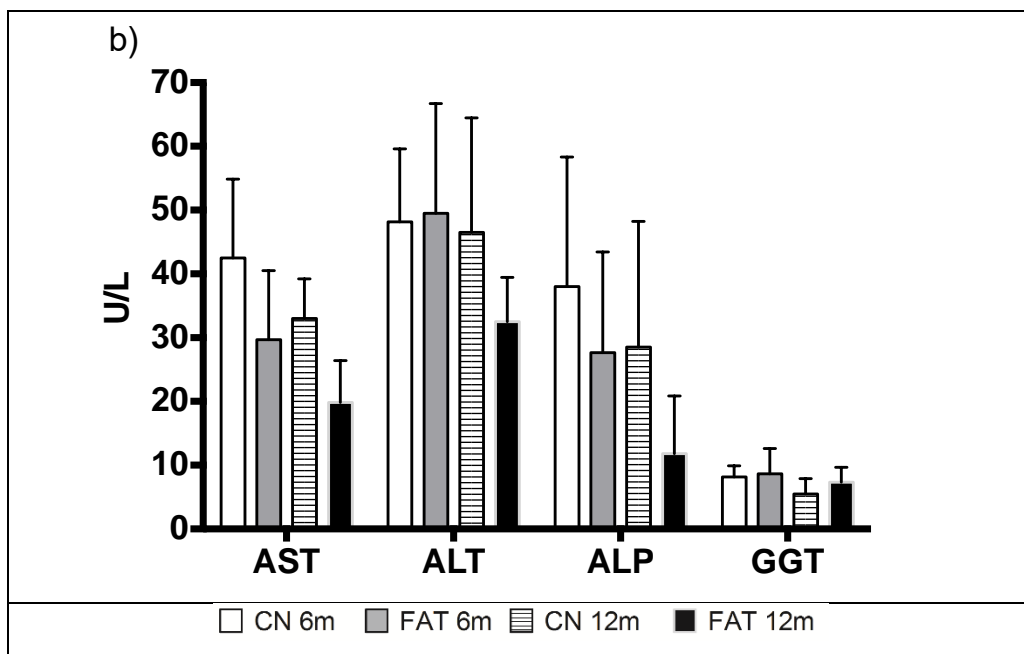
Gráfica 1. Modificación de peso corporal de los organismos control y tratamientos durante 12 meses.

Parámetros bioquímicos

Tampoco se observan diferencias significativas en los parámetros bioquímicos colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, LDL y glucosa (**gráfica. 2a**), ni en la cuantificación sérica de enzimas hepáticas: AST-Aspartato aminotransferasa, ALT-Alanina aminotransferasa, GGT- Gamma glutamil transpeptidasa y ALP-Fosfatasa alcalina (**gráfica. 2b**).



Gráfica 2a. Parámetros bioquímicos: Chol-Colesterol total, TG-triglicéridos, colesterol HDL y LDL, Glu-Glucemia.



Gráfica 2b. Enzimas hepáticas: AST-Aspartato aminotransferasa, ALT-Alanina aminotransferasa, GGT-Gamma glutamil transpeptidasa y ALP-Fosfatasa alcalina

Análisis histológico

La figura 7 nos permite observar infiltración mínima de grasa en el citoplasma de los hepatocitos a los 6 meses de tratamiento, sin embargo, es más notoria la infiltración a los 12 meses del tratamiento.

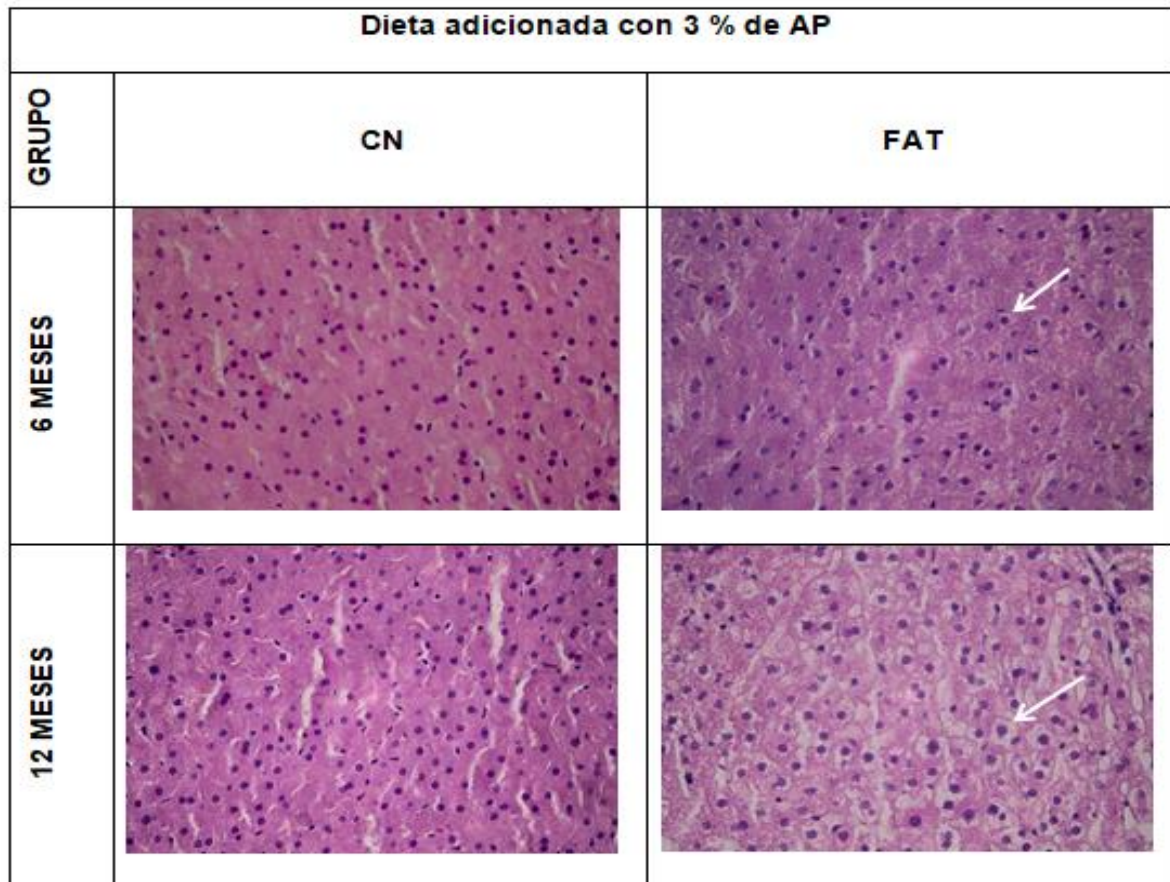


Figura 7. Cortes histológicos de hígado de conejos a los 6 y 12 meses del tratamiento con 3 % de ácido palmítico. Comparaciones de cortes histológicos de hígado de los grupos control y tratamiento, donde se muestra la infiltración grasa señalada con las flechas blancas (espacio blanco que rodea el punto morado).

Estandarización de primers

Para la estandarización de los *primers* se realizó la búsqueda de la secuencia de genes en la siguiente página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Nombre del gen		Secuencia	Producto
IL-13	Forward	5 ¹ CATTGCTGTGACCTGCCTT 3 ¹	106 pb
	Reverse	5 ¹ CTGGTTGTGTGTGATGTTGA 3 ¹	
IL-18	Forward	5 ¹ CCTCTCTGTGAAGTGTAAGAA 3 ¹	183 pb
	Reverse	5 ¹ AAGTATCCGTCATACAATGAAG 3 ¹	
Nrf2	Forward	5 ¹ AGATGAAGAGACAGGTGAAAT 3 ¹	221 pb
	Reverse	5 ¹ GGCTGGGAGTATCAGGAAC 3 ¹	
GAPDH	Forward	5 ¹ CTGGCAAAGTGGATGTTGT 3 ¹	163 pb
	Reverse	5 ¹ TCCTGGAAGATGGTGATGG 3 ¹	

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos para las moléculas IL-18, IL-13 y Nrf2..

Para validar la integridad del cDNA obtenido de los grupos experimentales, se realizaron PCRs punto final utilizando el gen constitutivo GAPDH, para después demostrar en migraciones electroforéticas el tamaño específico para cada amplificación (Figura 8).

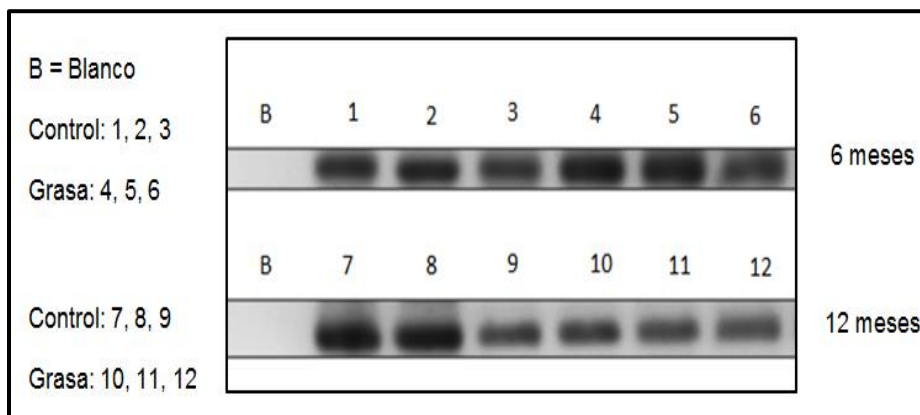


Figura 8. Validación del cDNA de los 4 grupos experimentales con el gen constitutivo GAPDH (163 pb) a una temperatura de disociación de 62°C, en gel de agarosa al 2.5%. Carriles “B= blanco” control negativo, los carriles posteriores muestran la amplificación del producto. Carriles marcados con los números 1, 2, 3 grupo control de 6 meses, carriles 7, 8, 9 grupo control de 12 meses, carriles 4, 5, 6 y 10, 11, 12 que son los grupos grasa de 6 y 12 meses respectivamente.

Como se puede observar en la imagen anterior los amplicones de los cuatro grupos experimentales muestran el tamaño correcto de amplificación para GAPDH (163 pb).- Una vez validada la especificidad de la reacción, el cDNA se uso en la reacción de qPCR tiempo real.

Para validar la correcta amplificación y especificidad de los *primers*, los resultados de la PCR se revelaron en migraciones electroforéticas en geles de agarosa al 2.5 %.

Las migraciones nos permitieron observar y confirmar que no hubo errores en el proceso de amplificación y que solo se amplificaron productos específicos. También se confirmó las temperaturas de amplificación para IL-13 (57° C), mientras que para IL-18 y Nrf2 fue de 62° C (Figura 9).

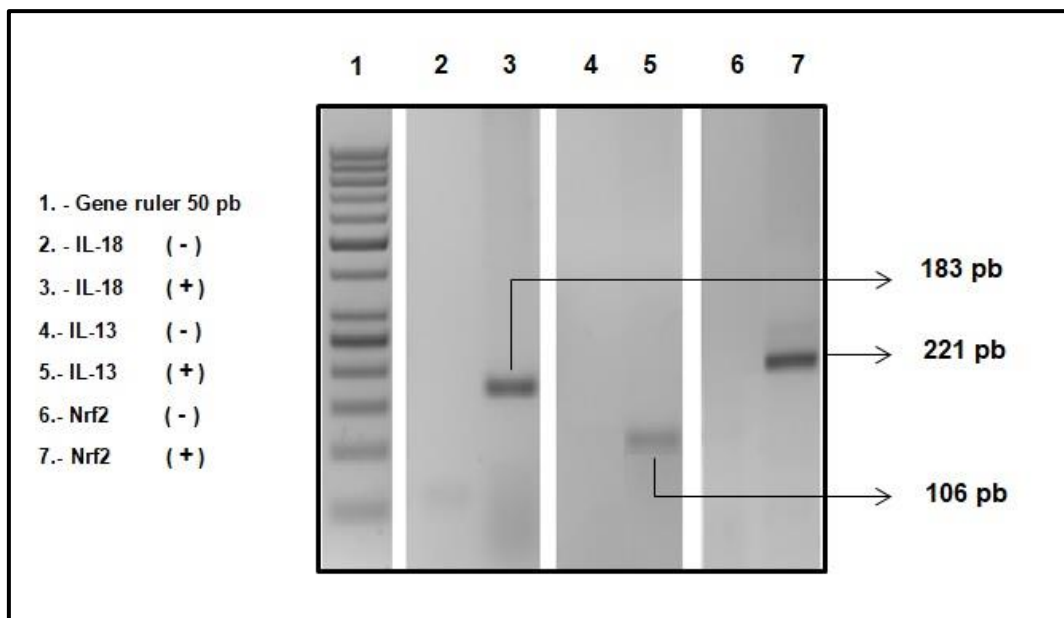


Figura 9. Validación de la correcta amplificación de los primers IL-18, IL-13 y Nrf2 en gel de agarosa al 2.5 %. En el carril 1 se muestra con 50 pares de bases (pb) el marcador nuclear, posteriormente en los carriles 3, 5 y 7 se observa la banda con la longitud del producto para cada gen, así como su control negativo para cada uno (carriles: 2, 4 y 6).

Curvas de disociación (Melt curve)

El cDNA fue utilizado como templado para las reacciones de Q-rt-PCR por triplicado desde los 60° C hasta los 95 °C, para poder observar la presencia de un solo amplificado (**figura 10**).

Expresión relativa

Una vez comprobada la especificidad y la temperatura de disociación, se evaluó la expresión relativa de IL-13, IL-18 y Nrf2, comparándolas con el gen constitutivo GAPDH mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa) del cDNA obtenido a partir del RNA por Transcriptasa reversa.

Los resultados para cada uno de los tres genes se normalizaron por separado utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

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

Dónde: **g** = grupo control de grasa; **c** = control; **gen** = ya sea IL-13, IL-18, Nrf2 o GAPDH.

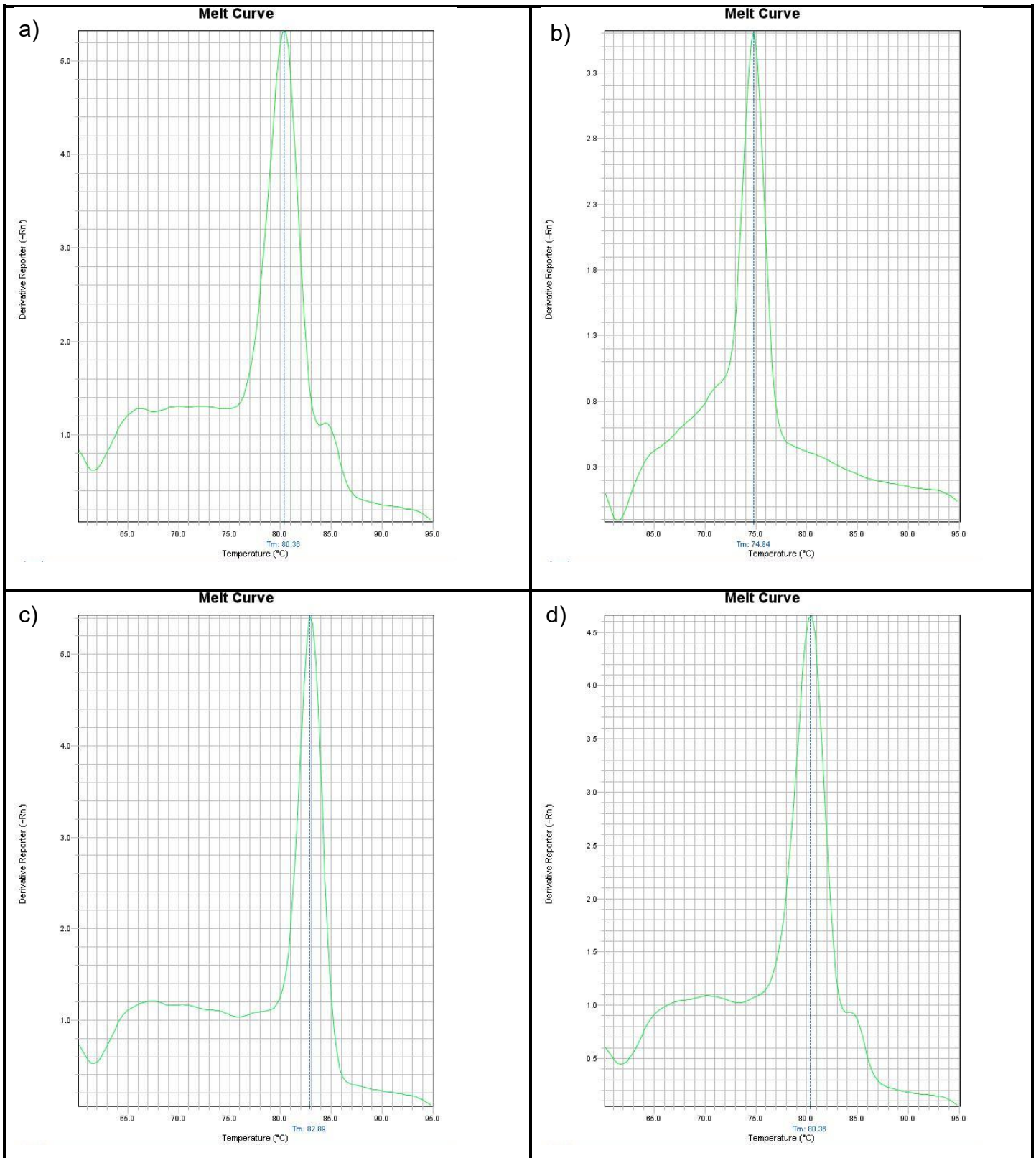
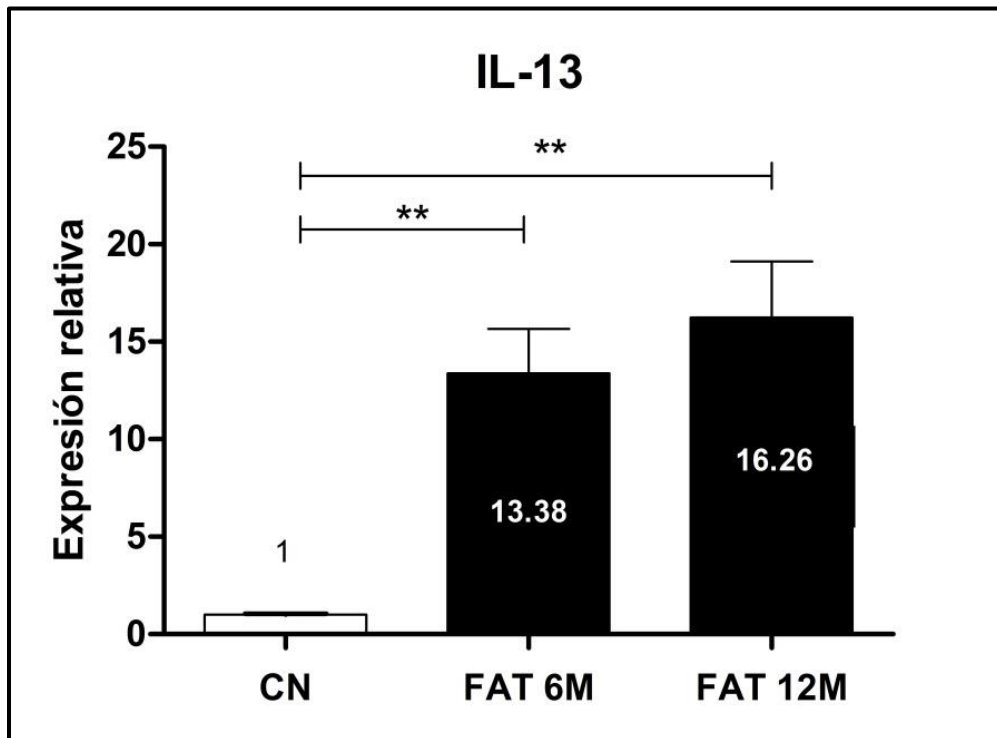


Figura 10. Curvas de disociación (*Melt curve*). a) GAPDH, b) IL-13, c) IL-18, d) Nrf2. Se puede observar la Tm de amplificación de productos específicos para cada primer.

IL-13 comparación de 6 y 12 meses de tratamiento.

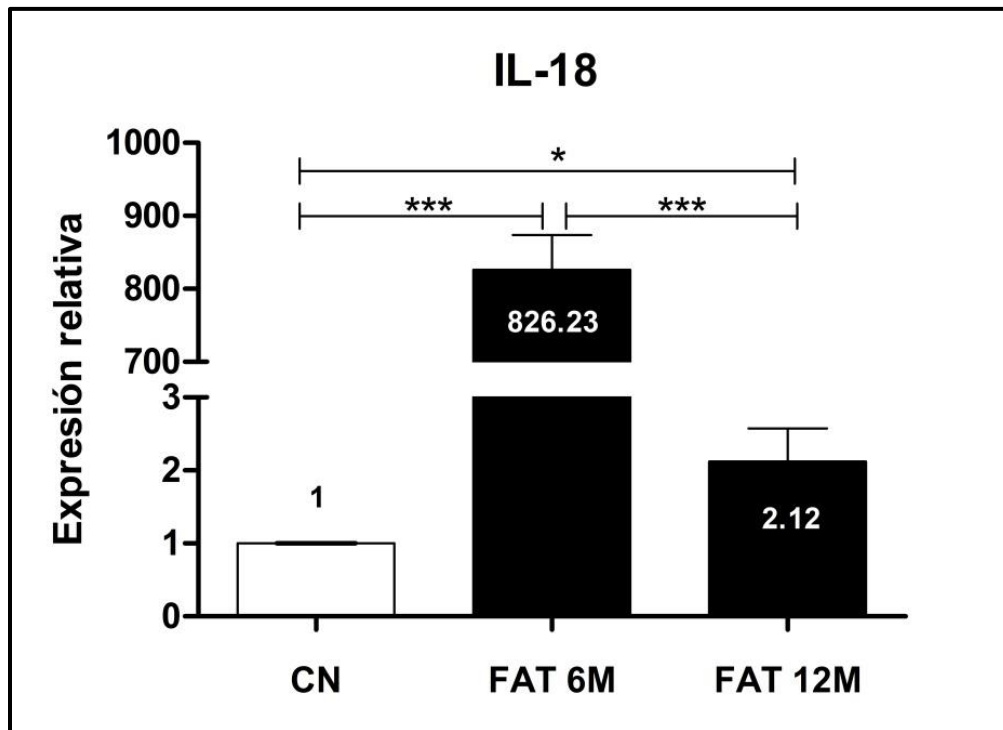
La gráfica 3 muestra que los mensajeros de IL-13 se sobreexpresaron 13.38 y 16.26 veces en los grupos FAT de 6 y 12 meses respectivamente en comparación del grupo control, resultado estadísticamente significativo ($p < 0.0018$). Al comparar los grupos FAT, se nota una ligera elevación en la expresión a los 12 meses, sin deferencias estadística entre estos grupos.



Gráfica 3. Expresión relativa de IL-13 a los 6 y 12 meses de tratamiento con dieta grasa de 3 % de ácido palmítico. CN: Control; FAT 6M (Dieta con 3 % de AP por 6 meses); FAT 12M (Dieta con 3 % de AP por 12 meses). Los grupos se compararon con una prueba de t Student $**p = 0.0018$, la barra muestra el error estándar de la media.

IL-18 comparación de 6 y 12 meses de tratamiento.

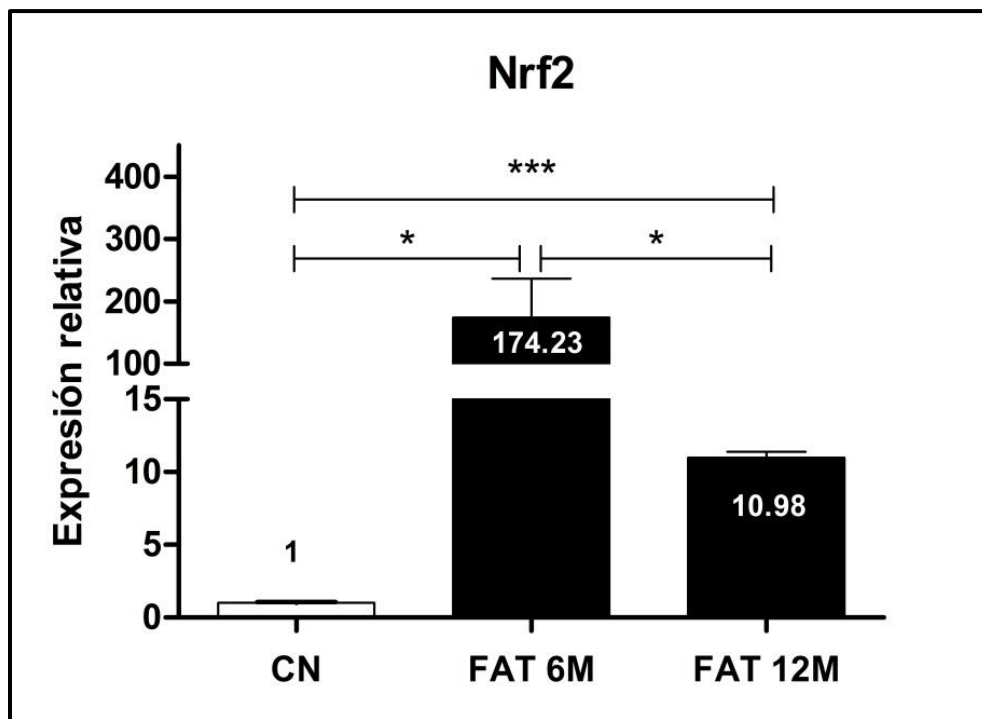
La gráfica 4 muestra la expresión de los mensajeros de IL-18, en los grupos FAT de 6M y 12M se observa un incremento en la expresión de 826.23 y 2.12 veces respectivamente, en comparación con el control, diferencia estadísticamente significativa, control (CN) vs grasa 6 meses (FAT 6M) $p= 0.0001$ y control (CN) vs grasa 12 meses (FAT 12M) $p= 0.0464$. Al comparar los grupos FAT se observa una disminución en la expresión a los 12 meses de tratamiento con una diferencia significativa ($p=0.0001$).



Gráfica 4. Expresión relativa de IL-18 a los 6 y 12 meses del tratamiento con dieta grasa de 3 % de ácido palmítico. CN: Control; FAT 6M: Dieta con 3 % de AP por 6 meses; FAT 12M; Dieta con 3 % de AP por 12 meses. Los grupos se compararon con una prueba de t Student $*p= 0.0464$, $***p= 0.0001$, la barra muestra el error estándar de la media.

Nrf2 comparación de 6 y 12 meses de tratamiento.

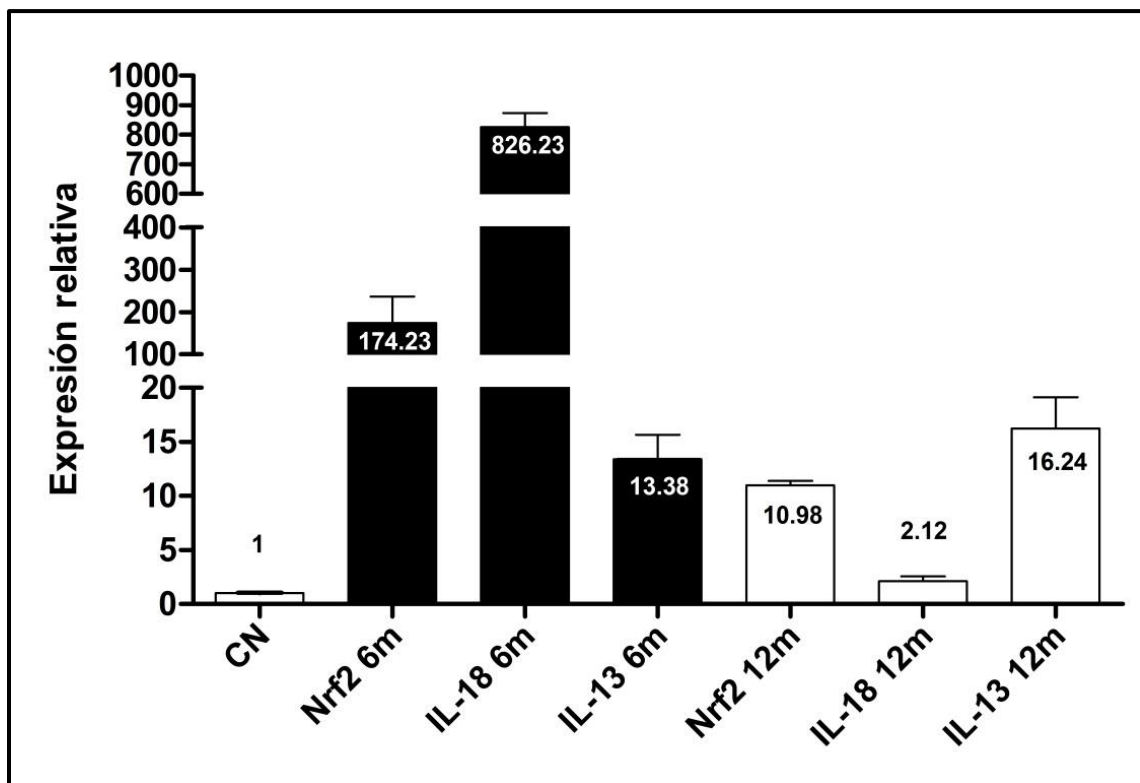
La gráfica 5 observamos la expresión de Nrf2, en el grupo FAT a los 6 meses de tratamiento aumentó 174.23 veces en comparación con el CN con una $p=0.0322$, mientras que a los 12 meses, su expresión se incrementó 10.98 veces en comparación con el CN con una $p=0.0001$. Por otro lado, al comparar la expresión entre los grupos FAT 6M y 12M, se encontraron diferencias significativas $p=0.0399$.



Gráfica 5. Expresión relativa de Nrf2 a los 6 y 12 meses del tratamiento con dieta grasa de 3 % de ácido palmítico. CN: Control; FAT 6M (Dieta con 3 % de AP por 6 meses); FAT 12M (Dieta con 3 % de AP por 12 meses). Los grupos se compararon con una prueba de t Student * $p= 0.0399$, *** $p= 0.0001$, la barra muestra el error estándar de la media.

Expresión de moléculas a 6 y 12 meses de tratamiento

La gráfica 6 nos permite observar de manera integral y de forma comparativa la expresión de las tres moléculas a los 6 y 12 meses de tratamiento, donde observamos que la IL-13 fue la única molécula que no presentó diferencias en su expresión a los 6 y 12 meses de tratamiento, sin embargo en ambos tiempos se encuentra sobre expresada; por otro lado a los 12 meses de tratamiento la molécula Nrf2 presentó una disminución en su expresión sin llegar a normalizarse con el control; resultado semejante al de IL-18.



Gráfica 6. Comparativo de la expresión de moléculas IL-13, IL-18 y Nrf2. La expresión de las moléculas se ve disminuida significativamente a los 12 meses del tratamiento

DISCUSIÓN

La obesidad y el sobrepeso son condiciones causadas principalmente por la ingesta de alimentos ricos en grasas saturadas, a tal punto que se han convertido en uno de los problemas de salud pública con mayor impacto a nivel mundial (Contreras-Leal and Santiago-García 2011). Al mismo tiempo estas alteraciones están fuertemente relacionados con la esteatosis hepática, enfermedad del hígado graso no alcohólico que puede progresar y ser un precursor de enfermedades hepáticas más graves, como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Los mecanismos patogénicos subyacentes a la progresión de la esteatosis a NASH siguen sin estar claros; sin embargo, la inflamación, las citocinas proinflamatorias y el estrés oxidativo se han postulado para desempeñar papeles clave (Joshi-Barve *et al.* 2007).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de una dieta adicionada con 3 % de ácido palmítico sobre el progreso del fenómeno inflamatorio en hígado, órgano clave del metabolismo de lípidos y la respuesta inmunológica; que se ve afectado principalmente por el depósito ectópico de grasas (Feldstein *et al.* 2003; Lana *et al.* 2016).

Diferentes estudios relacionan las dietas ricas en lípidos con el incremento del tejido adiposo, el desarrollo de sobrepeso y obesidad, condiciones que inducen la elevación de triglicéridos, disminución de colesterol HDL, elevación de colesterol LDL y elevación de la glucosa (Lizazaburu Robles 2013). Sin embargo, nuestros resultados indican que la dieta adicionada con 3 % de AP no induce sobrepeso en los organismos durante los 6 y 12 meses (**gráfica 1**) y no altera las pruebas bioquímicas de lípidos y glucosa (**gráfica 2a**). De la misma manera se ha reportado que la elevación de AST-Aspartato aminotransferasa, ALT-Alanina aminotransferasa, GGT- Gamma glutamil transpeptidasa y ALP-Fosfatasa alcalina, son indicadores de daño hepático (Daza and Juan 2008). Sin embargo nuestro análisis no muestran alteraciones en la concentración de estas enzimas (**gráfica 2b**); es decir; la dieta adicionada con 3 % de AP no causó sobrepeso ni obesidad, ni cambios en los lípidos evaluados, tampoco muestra cambios en las concentraciones de enzimas hepáticas, lo que nos indica que el consumo de 3 %

de AP es bajo como para provocar alteraciones en este tipo de estudios analizados, incluso la OMS recomienda en humanos un consumo de grasas saturadas de hasta el 10% en la ingesta calórica diaria, para evitar el aumento de peso corporal (OMS, 2015).

Por otra parte se ha reportado que la exposición a AP causa acumulación grasa en hepatocitos, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, como lo reporta Joshi-Barve *et al.* en el 2007 quien administró una dieta adicionada con 10 % de AP en cultivos *in vitro* de hepatocitos durante 24 h observando como resultado una acumulación 2.5 veces mayor de TG en el cultivo tratado con AP que en los hepatocitos no tratados. Datos que concuerdan con nuestros resultados, donde el análisis histológico del tejido hepático, nos permitió observar infiltración grasa (característica de esteatosis) mínima a los 6 meses y de manera más notoria a los 12 meses del tratamiento (**figura 7**), lo que indica que el consumo de AP en bajas dosis (3 %) en periodos prolongados es capaz de inducir esteatosis hepática.

Está documentado que las dietas hipercalóricas favorecen el desarrollo del fenómeno inflamatorio (Ramirez *et al.* 2016), así como, la acumulación excesiva de TG en hepatocitos, evento relacionado con el EO (Rolo, Teodoro, and Palmeira 2012). Sin embargo el tejido hepático cuenta con moléculas que desempeñan un papel de regulación de las vías inflamatorias y el mantenimiento de la homeostasis hepática (Lana *et al.* 2016).

En este proyecto también se evaluó la expresión hepática de IL-13 a nivel transcripcional, ya que se ha reportado tiene propiedades antiinflamatorias (de Oliveira *et al.* 2011). Darkhal *et al.* en 2015, trabajaron con ratones con obesidad inducida por una dieta hipercalórica y que sobreexpresaban la IL-13, con lo que demostraron que la sobreexpresión de IL-13 actuó como inhibidor del depósito ectópico de lípidos a nivel hepático, controlar la ganancia de peso por la dieta hipercalórica, y regular las concentraciones de glucosa e insulina.

Estos resultados coinciden con los nuestros ya que la sobreexpresión de IL-13 se mantuvo durante los 6 y 12 meses de experimentación (**Gráfica 3**), resultado que es coincidente con la ausencia de cambios en el peso (**gráfica 1**) y cambios en los

parámetros metabólicos evaluados (**gráfica 2a**). Sin embargo en el análisis histológico (**figura 7**) pudimos observar infiltración de grasa hepática (esteatosis) a los 6 y 12 meses en los grupos experimentales. No obstante, no se observa evidencias de HGNA, lo que revela una probable función de IL-13 como modulador del desequilibrio de estos factores originados por la dieta de 3 % de AP.

La IL-18 es una citocina conocida principalmente por sus propiedades proinflamatorias, aunque en diversos estudios se ha descrito que tiene propiedades como regulador de la homeostasis energética (Zorrilla *et al.* 2007).

Netea *et al.* en el 2006, trabajó con ratones knockout IL-18^{-/-}, y observó que a los 3 meses de edad tenían un peso corporal notablemente mayor en comparación con el grupo control IL-18^{+/+}, a los 6 meses los ratones IL-18^{-/-} pesaban 18.5 % más que el grupo IL-18^{+/+}, mientras que a los 12 meses IL-18^{-/-} pesaban 38 % más que el grupo IL-18^{+/+}, llegando a la conclusión de que la deficiencia de esta citocina genera mayor apetito que en los ratones IL-18^{-/-}, y por ende mayor ingesta de alimentos, acumulación excesiva de tejido adiposo y obesidad, además de que a los 6 meses de edad, favorece el desarrollo de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperglucemia, factores relacionados con síndrome metabólico. Por otro lado, se observó que la administración de IL-18 a ratones expuestos a dietas ricas en carbohidratos y lípidos, disminuye el daño hepático por las dietas hipercalóricas y regulan la ganancia de peso, lo que indica que puede desarrollar una función reguladora de la homeostasis energética Lana *et al.* en el 2016.

Nuestros resultados muestran (**gráfica 4**) la sobreexpresión estadísticamente significativa de IL-18 a los 6 y 12 meses de experimentación en comparación con el control, por otro lado al comparar los grupos experimentales de 6 y 12 meses se puede apreciar una disminución significativa en la expresión de la molécula a los 12 meses. Zorrilla *et al.* en el 2007 documenta que una comida rica en grasas hace que los niveles de IL-18 circulante aumenten. Por lo que podemos inferir que la dieta adicional con 3 % de ácido palmítico, indujo la sobre expresión de IL-18 a los 6 meses, actuando como un regulador del balance de energía positiva,

posiblemente modulando la ingesta energética, evitando la ganancia de peso y alteración en los parámetros sanguíneos evaluados.

El consumo de dietas altas en grasa también puede alterar el metabolismo del oxígeno ya que los depósitos de grasa son vulnerables a sufrir reacciones de oxidación y si la producción de ERO excede la capacidad antioxidante de la célula, el EO que produce por la peroxidación lipídica podría contribuir a causar daños directos o indirectos de a diferentes órganos y/o la activación de vías inflamatorias (Bautista *et al.* 2011; Xavier *et al.* 2016).

Nrf2 es un factor de transcripción que regula el estado redox, y media la inducción de genes antioxidantes y desintoxicantes estimulados por el estrés, regula positivamente la reparación y degradación de moléculas dañadas, modulando el metabolismo además, inhibe la lipogénesis y favorece la β -oxidación de ácidos grasos (Hayes and Dinkova-Kostova 2014). Se ha sugerido también que el sistema Nrf2 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación (Königsberg Fainstein M 2007).

En nuestros resultados (**gráfica 5**) podemos observar que Nrf2 se ve sobre expresada 174.23 veces más a los 6 meses de tratamiento en comparación con el control. Rolo, Teodoro, and Palmeira en el 2012 mencionan que la acumulación en exceso de triglicéridos en los hepatocitos deteriora la capacidad oxidativa de las mitocondrias alterando el estado redox de la CTE y las vías peroxisomal y microsomal por ende el escape masivo de moléculas oxidantes. Lo que podría explicar la elevación en la transcripción de Nrf2 a los 6 meses. Sin embargo, a los 12 meses la expresión se ve disminuida no ha niveles basales como el grupo control, pero si una disminución significativa en comparación con el tratamiento de los 6 meses. Posiblemente este resultado se pueda atribuir a la función de IL-18 como regulador metabólico de la homeostasis energética (Lana *et al.* 2016; Netea *et al.* 2006), función reflejada en la disminución de su expresión a los 12 meses del tratamiento (**gráfica 4**). Esta acción posiblemente propicia un efecto en la CTE, disminuyendo la liberación de moléculas oxidantes (e^-) y con ello la disminución en la expresión de Nrf2 a los 12 meses del tratamiento (**gráfica 5**).

CONCLUSIÓN

- La ingesta de 6 y 12 meses de la dieta adicionada con 3 % de ácido palmítico, no causo cambios en el peso de los organismos ni alteraciones en los parámetros bioquímicos evaluados (colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, LDL ni glucosa).
- La dieta adicionada con 3 % de AP no altera la concentración sérica de enzimas hepáticas: AST-Aspartato aminotransferasa, ALT-Alanina aminotransferasa, GGT- Gamma glutamil transpeptidasa y ALP-Fosfatasa alcalina.
- El consumo crónico de ácido palmítico (3 %) es capaz de inducir la acumulación ectópica de grasa en tejido hepático (Esteatosis hepática).
- La ingesta crónica (6 y 12 meses) de ácido palmítico induce la sobreexpresión de IL-13, fenómeno relacionado con el desarrollo de inflamación.
- La dieta adicionada con 3 % de AP, indujo la sobre expresión de IL-18 a los 6 meses, actuando posiblemente como un regulador del balance energético positivo, y como modulador de la ingesta energética.
- La sobreexpresión de Nrf2 a los 6 meses del tratamiento, evidencia un posible desbalance en el estado redox, expresión que disminuyo a los 12 meses del tratamiento posiblemente acción de IL-18.
- En general la dieta adicionada con 3 % de ácido palmítico induce el desencadenamiento de inflamacion de bajo grado y estrés oxidativo, evidenciado por la modificación en la expresión de las moléculas IL-18, IL-13 y Nrf2.

PERSPECTIVAS

Este trabajo nos acerca un poco más al estudio del daño temprano en hígado ocasionado por el consumo crónico de ácido palmítico en una dosis (3 %) que se asemeja a lo que se puede consumir cotidianamente dentro de una dieta diaria rica en grasas.

Está clara la relación que hay entre las dietas ricas en grasas y la acumulación ectópica de AGL en el hígado (esteatosis), sería conveniente realizar un análisis a nivel séricos de los AGL que hay durante el periodo de administración de la dieta.

Por otro lado, se ha reconocido la función de IL-18 como molécula con funciones proinflamatorias, sin embargo también tiene registros de actuar como una molécula reguladora del metabolismo energético, función que en base a la bibliografía y de acuerdo a nuestros resultados pudimos atribuirle a esta molécula, por lo tanto sería útil hacer un análisis más específico de la función de IL-18 para saber en qué punto pasa de realizar un trabajo a otro, para estar consciente de la función específica que está realizando en este trabajo.

Dado que los resultados de este trabajo brindan algún tipo de información sobre la relación que hay entre la dieta y el estrés oxidativo, sería importante realizar una cuantificación de especies reactivas de oxígeno para poder validar correctamente que este fenómeno se está presentando.

REFERENCIAS

- Acosta García, E. 2011. "Vigencia Del Síndrome." *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 45(3): 423–30.
- Aguilar-Salinas, Carlos Alberto *et al.* 2004. "El Síndrome Metabólico: Un Concepto En Evolución." *Gaceta Medica de Mexico* 140(SUPPL. 2): 41–48.
- Alberti, K. G M M *et al.* 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): 1640–45.
- Bastarrachea, R A, R Fuenmayor, I Brajkovich, and A G Comuzzie. 2005. "Entendiendo Las Causas de La Obesidad a Través de La Biología Celular Del Adipocito. Revisión." *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* 3(3): 20–29.
- Bautista, Mirandeli *et al.* 2011. "Inflammation , Oxidative Stress , and Obesity." 6: 3117–32.
- Blancas-Flores, G, Jc Almanza-Pérez, and Ri López-Roa. 2010. "La Obesidad Como Un Proceso Inflamatorio." *Boletín Medico del Hospital Infantil de México* 67(marzo-abril): 03–12.
- Bree, H Zevenbergen A De, M Zeelenberg K Laitinen, and G Van Duijn E Flöter. 2009. "Foods with a High Fat Quality Are Essential for Healthy Diets." 54(suppl 1): 15–24.
- Caballería, Llorenç, Pere Torán, María Auladell, and Guillem Pera. 2008. "Esteatosis Hepática No Alcohólica . Puesta Al Día." *Aten. Primaria* 40(8): 419–24.
- Calder, Philip C *et al.* 2018. "Dietary Factors and Low-Grade Inflammation in Relation to Overweight and Obesity."
- Camacho, Nolis *et al.* 2009. "Esteatosis Hepática En Niños Y Adolescentes Obesos: Asociación Con Adiposidad, Lípidos, Insulina Y Enzimas Hepáticas." *Nolis Camacho. nolispediatra@hotmail.com Rev Venez Endocrinol Metab* 8(1): 19–29.

- Contreras-Leal, Érika A., and Juan Santiago-García. 2011. "Revista Biomédica." *Revista Biomédica, ISSN-e 0188-493X, Vol. 22, N^o. 3, 2011, págs. 103-115* 22(3): 103–15.
- Crepaldi, Gaetano, and Stefania Maggi. 2006. "El Síndrome Metabólico: Contexto Histórico." *Diabetes' Voice* 51(Special): 8–10.
- Cusi, Kenneth. 2009. "Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis." 13: 545–63.
- Darkhal, P, M Gao, Y Ma, and D Liu. 2015. "Blocking High-Fat Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance and Fatty Liver by Overexpression of IL-13 Gene in Mice." *International journal of obesity (2005)* 39(8): 1292–99.
- Daza, Eduardo Fernández, and Eduardo Fernández Juan. 2008. "Aproximación Al Diagnóstico de Enfermedades Hepáticas Por El Laboratorio Clínico." *Medicina y Laboratorio* 14(11–12): 533–46.
- Epidemiology, Nutritional et al. 2018. "Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical." (January): 1549–58.
- Esteve Ràfols, Montserrat. 2014. "Tejido Adiposo: Heterogeneidad Celular Y Diversidad Funcional." *Endocrinología y Nutrición* 61(2): 100–112.
- Feldstein, Ariel E. et al. 2003. "Diet Associated Hepatic Steatosis Sensitizes to Fas Mediated Liver Injury in Mice." *Journal of Hepatology* 39(6): 978–83.
- Flores-Lázaro, José Rolando, and Erika Rodríguez-Martínez. 2011. "Consecuencias Metabólicas de La Alteración Funcional Del Tejido Adiposo En El Paciente Con Obesidad." *Rev Med Hosp Gen Méx* 74(74): 157–65.
- Garaulet, Marta et al. 2008. "Obesidad Y Ciclos de Vida Del Adulto." *Rev Esp Nutr Comunitaria* 14(3): 150–55.
- Gomez-ambrosi, Javier, Clínica Universidad De Navarra, Javier Gómez-ambrosi, and Amaia Rodríguez. 2013. "Asociada a La Obesidad Revisión Revisión Papel Del Tejido Adiposo En La Inflamación Asociada a La Obesidad." (December).
- Hayes, John D., and Albena T. Dinkova-Kostova. 2014. "The Nrf2 Regulatory Network Provides an Interface between Redox and Intermediary Metabolism."

- Trends in Biochemical Sciences* 39(4): 199–218.
- Hernández, Elisa Álvarez *et al.* 2017. “Acute Dietary Fat Intake Initiates Alterations in Energy Metabolism and Insulin Resistance.” 127(2): 695–708.
- Hita, Mercedes González *et al.* 2002. “Edigraphic.com.” 10.
- Idf, The. “Metabolic Syndrome.”
- Izquierdo, Adriana, and Gema Medina-Gómez. 2012. “Papel de La Lipotoxicidad En El Desarrollo de La Lesión Renal En El Síndrome Metabólico Y El Envejecimiento.” *Dialisis y Trasplante* 33(3): 89–96.
- Joshi-Barve, Swati *et al.* 2007. “Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Cytokine Interleukin-8 from Hepatocytes.” *Hepatology* 46(3): 823–30.
- Kershaw, Erin E., and Jeffrey S. Flier. 2004. “Adipose Tissue as an Endocrine Organ.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(6): 2548–56.
- Königsberg Fainstein M. 2007. “Nrf2: La Historia de Un Nuevo Factor de Transcripción Que Responde a Estrés Oxidativo.” *Reb* 26(1): 18–25.
- Lana, Jaqueline Pereira *et al.* 2016. “TNF and IL-18 Cytokines May Regulate Liver Fat Storage under Homeostasis Conditions.” *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 41(12): 1295–1302.
- Laugerette, Fabienne *et al.* . 2018. “Oil Composition of High-Fat Diet Affects Metabolic Inflammation Differently in Connection with Endotoxin Receptors in Mice.” 4: 374–86.
- Lizazaburu Robles, Juan Carlos. 2013. “Síndrome Metabólico : Concepto Y Aplicación Práctica Metabolic Syndrome : Concept and Practical Application Juan Carlos Lizazaburu Robles.” *Articulo De Revision:* 315–20.
- Madrigal, Jaime Carranza. 2008. “Artículo Original El Síndrome Metabólico En México.” 24(4): 251–61.
- Mancini, Annamaria *et al.* 2015. “Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health.” : 17339–61.
- Manuscript, Author, and Liver Disease. 2010. “NIH Public Access.” 28(4): 360–69.
- Marcano, Yamileth *et al.* 2006. “Funciones Endocrinas Del Tejido Adiposo.” *Rev*

- Venez Endocrinol Metab* 4(1): 15–21.
- Martínez-abundis, Eduardo, Martha A Sánchez-rodríguez, and El Hafidibentlakder. 2005. "Participación de La Mitocondria En El Desarrollo de Estrés Oxidativo En La Obesidad." *Bioquímica* 30: 10.
- Martínez, Jesús, and Patricia Victoria Torres. 2013. "Los Ácidos Grasos Y La Lipotoxicidad : Implicaciones Metabólicas." 56: 5–18.
- Masaki, Takayuki *et al.* 2004. "Adiponectin Protects LPS-Induced Liver Injury through Modulation of TNF-?? In KK-Ay Obese Mice." *Hepatology* 40(1): 177–84.
- Medica Del, Revista *et al.* 2008. "Www.medigraphic.com HOSPITAL GENERAL Prevalencia Del Síndrome Metabólico Entre Adultos Mexicanos No Diabéticos, Usando Las Definiciones de La OMS, NCEP-ATPIIIa E IDF." *Rev Med Hosp Gen Mex* 71(71): 11–19.
- Méndez-Sánchez, Nahum, Norberte C. Chávez-Tapia, and Misael Uribe. 2004. "Obesidad Y Esteatohepatitis No Alcohólica." *Gaceta Medica de Mexico* 140(SUPPL. 2): 67–72.
- Milić, Sandra, Davorka Lulić, and Davor Štimac. 2014. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity: Biochemical, Metabolic and Clinical Presentations." *World Journal of Gastroenterology* 20(28): 9330–37.
- Mora G, O L *et al.* 2000. "Palm Oil: Health and Human Nutrition." *Palmas* 21(4): 19–27.
- Moreno, M J, and J. A. Martínez. 2002. "El Tejido Adiposo: Órgano de Almacenamiento Y Órgano Secretor." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 25(SUPPL. 1): 29–39.
- Murguia-Romero, Miguel *et al.* 2015. "Prevalence of Metabolic Syndrome in Young Mexicans: A Sensitivity Analysis on Its Components." *Nutricion hospitalaria* 32(n01): 189–95.
- Murphy, Andrew J *et al.* 2016. "IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome Article IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome." *Cell Metabolism* 23(1): 155–64.

- Netea, Mihai G. *et al.* 2006. "Deficiency of Interleukin-18 in Mice Leads to Hyperphagia, Obesity and Insulin Resistance." *Nature Medicine* 12(6): 650–56.
- de Oliveira, Caio Marcio Barros *et al.* 2011. "Cytokines and Pain." *Revista brasileira de anestesiologia* 61(2): 255–65.
- Pajuelo, Jaime, and José Sánchez. 2007. "El Síndrome Metabólico En Adultos, En El Perú." *Anales de la Facultad de Medicina* 68(1): 38–46.
- Ramirez, Dario C, D Ph, Sandra E Gomez Mejiba, and D Ph. 2016. "Revista Peruana de Divulgación Científica En Genética Y Biología Molecular Mecanismos Moleculares Y Terapéuticas Para Reducir La Inflamación Del Tejido Adiposo En La Obesidad Molecular Mechanisms and Therapeutics to Reduce Adipose Tissue Inflammation in O." 1(1): 10–13.
- Rolo, Anabela P, João S Teodoro, and Carlos M Palmeira. 2012. "Free Radical Biology & Medicine Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Free Radical Biology and Medicine* 52(1): 59–69.
- Rosado-pérez, Juana, and Víctor Manuel Mendoza-núñez. 2007. "Artemisa Inflamación Crónica Y Estrés Oxidativo En La Diabetes Mellitus." (55): 8–9.
- Sánchez-Ramón, Silvia, Francisco Javier López-Longo, and Luis Carreño. 2010. "Interleucinas En La Fisiopatología de La Artritis Reumatoide: Más Allá de Las Citocinas Proinflamatorias." *Reumatología Clínica* 6(SUPPL. 3).
- Santos, Luisa Fernanda *et al.* 2010. "Enfermedad Hepática Por Infiltración Grasa No Alcohólica: La Nueva Pandemia Del Milenio: [Revisión]." *Rev. colomb. gastroenterol* 25(2): 380–98.
- Schmid-Grendelmeier, P. *et al.* 2002. "Eosinophils Express Functional IL-13 in Eosinophilic Inflammatory Diseases." *The Journal of Immunology* 169(2): 1021–27.
- Shamah-Levi, Teresa, Lucía Cuevas-Nasu, Juan Dommarco-Rivera, and Mauricio Hernandez-Avila. 2016. "Encuesta Nacional de Salud Y Nutrición de Medio Camino 2016. (ENSANUT MC 2016)." *Instituto Nacional de Salud Pública* 2016(Ensanut): 151.

- Soca, Pedro Enrique Miguel, and Aluett Niño Peña. 2009. "Consecuencias de La Obesidad." *Acimed* 20(4): 84–92.
- Stanton, Michaela C *et al.* 2011. "Inflammatory Signals Shift from Adipose to Liver during High Fat Feeding and Influence the Development of Steatohepatitis in Mice." *Journal of Inflammation* 8(1): 8.
- Suárez Carmona, Walter, Antonio Sánchez Oliver, and José González Jurado. 2017. "Fisiopatología de La Obesidad: Perspectiva Actual." *Revista chilena de nutrición* 44(3): 226–33.
- Vargas, Leonardo. 1995. "Interleucina 13: Una Citocina Con Propiedades Similares a IL-4." *Iatreia* 8(4): 160–65.
- Vázquez-Vela, Maria Eugenia Frigolet, Nimbe Torres, and Armando R. Tovar. 2008. "White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity." *Archives of Medical Research* 39(8): 715–28.
- Vergara CI, Martinez BM, Caraballo LR. 1994. "Las Moléculas de La Emoción." *Biomédica* 14: 172–79.
- Wesley, S.R.A.G., and H Supiicy. 2009. "Metabolic Syndrome ." *Revista Brasileira de Medicina* 66(3): 36–45.
- Wronska, A., and Z. Kmiec. 2012. "Structural and Biochemical Characteristics of Various White Adipose Tissue Depots." *Acta Physiologica* 205(2): 194–208.
- Wyatt, Sharon B., Karen P. Winters, and Patricia M. Dubbert. 2006. "Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem." *The American Journal of the Medical Sciences* 331(4): 166–74.
- Xavier, Andre Machado *et al.* 2016. "Inflammation , Stress , and Diabetes." *Zhao, L., Zhang, F., Ding, X., Wu, G., Lam, Y. Y., Wang, X., ... Zeng, Y. (2018). Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. Science, 1156(March), 1151–1156. <https://doi.org/10.1126/science.aao5774>*
- Leite, A. Z., Rodrigues 8(3): 346–58.
- Zámbó, Veronika *et al.* 2013. "Lipotoxicity in the Liver." *World Journal of Hepatology* 5(10): 550–57.
- Zorrilla, E. P. *et al.* 2007. "Interleukin-18 Controls Energy Homeostasis by

Suppressing Appetite and Feed Efficiency.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(26): 11097–102.

Zulet, M A, B Puchau, C Navarro, and A Martí J A Martínez. 2007. “Biomarcadores Del Estado Inflamatorio : Nexo de Unión Con La Obesidad Y Complicaciones Asociadas BETWEEN OBESITY AND ASSOCIATED.” 22(5): 511–27.

ANEXOS

Anexo 1

Técnica histológica

- Fijación:
- Paraformaldehído al 4%.
- Reactivos:
- Paraformaldehído 20 gr.
- Agua destilada 450 mL

Procedimiento:

- Calentar a 60°C por 30 min.
- Adicionar 50 mL de PBS 10X.
- Ajustar pH a 7.2 con un potenciómetro.
- Aforar a un volumen de 500 mL.

Técnica histológica

Reactivos:

- Etanol
- Xilol
- Parafina
- Agua destilada
- Obtener fragmentos de hígado, riñón y pulmón y sumergir en paraformaldehído al 4% mínimo 12 horas.
- Lavar en agua corriente.
- Deshidratar en alcoholes graduales
- Etanol al 60% 60 min.
- Etanol al 70% 60 min.
- Etanol al 80% 60 min.
- Etanol al 96% 60 min.
- Etanol al 96% 60 min.
- Etanol absoluto 60 min.
- Etanol absoluto 60 min.
- Colocar los fragmentos en etanol-xilol 1:1 por 60 min.
- Colocar los fragmentos en xilol 60 min. dos veces.
- Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60°C.
- Inclusión definitiva de los fragmentos con parafina y dejar solidificar.

Desparafinado de laminillas

- Colocar las laminillas con los cortes en la estufa a 60° C por 10 min.
- Colocar los cortes en xilol por 5 min.
- Pasar las laminillas a una mezcla de xilol-etanol por 5 min.
- Transferir a etanol absoluto por 2 min.
- Transferir a etanol de 96° por 2 min.
- Enjuagar lento con agua destilada.

Técnica de tinción con hematoxilina y eosina (HyE)

Reactivos:

- Xilol
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Hematoxilina de Gill *
- Agua destilada 730 mL Yodato de sodio 0.2 g
- Etilenglicol 250 mL Sulfato de aluminio 17.6 g
- Hematoxilina anhidra (polvo) 2.0 g
- Ácido acético glacial 2.0 mL
- Si está en cristales pesar 2.36 g
- Para preparar se debe seguir el orden, agitar a temperatura ambiente (TA) por 1 hr., filtrar la primera vez antes de usar.
- Solución de alcohol-ácido.
- Solución de agua amoniacal 1% v/v
- Etanol de 70° 99 mL Hidróxido de amonio 1 mL
- Ácido clorhídrico (HCl) 1 mL Agua destilada 99 mL
- Eosina (Solución stock):
- Eosina amarillenta 1.0 g
- Agua destilada 20 mL
- Etanol de 96° 80 mL
- Solución de trabajo:
- Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C.
- Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

Procedimiento:

- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- Hidratar con etanol absoluto y etanol de 96o
- por 2 min c/u.
- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- Sumergir rápidamente en agua amoniaca (2 inmersiones).
- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- Deshidratar con etanol de 96 (2 cambios) 2 min c/u.
- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- Montar con resina sintética.

Anexo 2

Extracción de ARN con Fenol Ácido

Reactivos

- Buffer AE (para 100mL)
- Acetato de Sodio 3M pH 5.2 a 1.67 mL
- EDTA 6.5 M pH 8 a 2 mL
- H₂O a 96.33 mL

Método:

- Lavar tejido con 500 µl de Buffer AE para remover excedente de sangre.

- Picar tejido, adicionar 500 µl de buffer AE y transferir a un tubo limpio (tubo 1), adicionar 5 µl de Diethyl pyrocarbonate puro (DEPC).
- En un tubo (tubo2) poner 300 mg de perlas de vidrio (aprox.) con 400 µl de fenol ácido y 20 µl de SDS al 20% y colocar el tubo a 65° C (previamente al siguiente paso).
- Vertir el contenido del tubo 1 en el tubo 2, mezclar en vortex 30 s. y luego colocar a 65 °C durante 5 min. (x2)
- Colocar los tubos a -70°C durante 5 min.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min. Recuperar la fase acuosa en tubo eppendorf nuevo
- Segundo lavado de Fenol: agregar 400 µl de Fenol ácido
- Vortex 30 s. centrifugar nuevamente a 13,000 rpm y recuperar fase acuosa-
- Agregar 250 µl de fenol ácido y 240 µl de solución Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
- Vortex 30 s.
- Centrifugación 13,000 rpm durante 5 min. Recuperar fase acuosa en eppendorf nuevo.
- Agregar 500 µl de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1) vortex 30 s. y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
- Recuperar fase acuosa en tubo nuevo midiendo lo que se recupera
- Precipitar ARN con 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3M y 2.5 volúmenes de Etanol 96 -100% grado biología molecular.
- Poner a -70° C de 20- 30 min.
- Centrifugar en frío 15 min a máx. velocidad (13,000 rpm)
- Desechar sobrenadante
- Lavar pellet con 500 µl de etanol 75% grado biología molecular
- Centrifugar en frío durante 3 min.a máx. velocidad
- Desechar sobrenadante y dejar secar pellet durante 5 min.
- Resuspender en agua DEPC a consideración (30 -100 µl) y guardar a -20°C.

Anexo 3

Síntesis de cDNA

En un tubo de PCR (tubo 1) se combinaron los siguientes reactivos

- RNA 5µg
- Random hexamers 1µl
- Annealing Buffer 1µl
- RNase/DNase-free wáter to 8µl.

Descripción del programa de corrida (Termociclador):

- Desnaturalización del RNA en un ciclo térmico de 65° C por 5 minutos.
- Posteriormente a la desnaturalización añadir los siguientes reactivos al tubo 1:

2X First-Strand Reaction Mix 10µl

SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix 2µl.

- Amplificación en un ciclo térmico de 50° C por 90 minutos

Anexo 4

PCR Punto Final

En un tubo de PCR combinar los siguientes reactivos

- Buffer 10X 2µl
- MgCl₂ [1.5 mM] 1µl
- dNTP's 2µl
- Taq Polimerasa 1 unidad por volumen de cDNA (.2µl)
- cDNA 2µl
- 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (Fw & Rv)
- H₂O DEPC cbp 20µl

Descripción del programa de corrida (Termociclador)

- 1.-Desnaturalización inicial 94° C por 5 minutos
- 40 ciclos constituidos por una desnaturalización a 94° C por 30 segundos, seguido de una alineación de 30 segundos a una temperatura que depende del oligo que sea utilizado y una amplificación a 72°C por 30 segundos.
- Extensión final a 72° C por 5 minutos

Anexo 5

Migraciones electroforéticas (preparación de gel de agarosa al 2.5% para marcador molecular de 50 pb)

Reactivos

- Agarosa
- TAE [1X]
- Bromuro de Etidio

En un matraz colocar .025 g de agarosa + 50 ml de buffer TAE (1X), y calentar y hasta que la mezcla sea homogénea (procurando evitar la formación de burbujas), y agregar 5µl de Bromuro de Etidio y mezclar perfectamente.

Preparación del Buffer TAE 10X

Reactivo	Cf	g
Tris	40mM	48.4g
Ácido acético glacial	-	11.42g
Na ₂ EDTA	2Mm	7.44g
H ₂ O destilada	-	cbp 1L

Anexo 6

qPCR Tiempo Real

Para todas las reacciones se ocupó el mix:

- Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (volumen),
- Primers Fw y Rv (IL-13, IL-18 y Nrf2) 0.5µl c/u
- cDNA 1µl
- H₂O DEPC cbp 20µl.

Las condiciones de amplificación fueron iguales para las 3 moléculas (IL-13, IL-18, Nrf2) y el control GAPDH.

- Paso inicial de 15 min a 95 °C,
- 40 ciclos a 95 °C
- Finalmente 1 min. A 60 °C.