



**Universidad Nacional Autónoma De México**  
**Facultad de Estudios Superiores de Iztacala**

**“ Expresión transcripcional de IL-33, ADA y XOR en  
hígado de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)  
alimentado con una dieta enriquecida con 20% de  
ácido palmítico”.**

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

PRESENTA

**Torres Herrera Andrea Viridiana**

Asesor de Tesis

Dr. en C. Juan Alberto Ponciano Gómez

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, enero 2023





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.

## **Dedicatoria y Agradecimientos**

Este trabajo como todos mis logros se los dedico a mis padres. Quiero agradecer a mi familia, a mis padres que por ellos “soy”, a mi hermano Rodrigo que cambió y cambia constantemente mi forma de ver la vida, a Jorge, gracias hermano, porque sin saberlo de cierto fuiste el primer maestro de vida que tuve, aquel que siendo niños me introdujo a los más grandes enigmas que tiene la humanidad y en los cuales seguimos trabajando... gracias y ¡Hasta siempre!

Gracias a la vida que me ha permitido incluso escribir esto. Gracias a todas las personas que han recorrido parte del camino a mi lado, por sus enseñanzas GRACIAS, a todos los amigos y compañeros, a los maestros que formaron parte de mi trayectoria académica y los cuales me inspiraron y me siguen inspirando a compartir el conocimiento, gracias al doctor Alberto Ponciano por la oportunidad no sólo de realizar mi trabajo de tesis, también por todo aquello que causó en mi cabeza aquel día que me habló de genética por primera vez... Gracias a todos los miembros del laboratorio de inmunología, al doctor Rafael que jamás dejó de sorprenderme no sólo por su vasto conocimiento, si no también por su gran humanidad, a Santiago eres un mentor único y te agradezco las enseñanzas en el laboratorio y la paciencia, a todos los trabajadores de la FESI que hicieron posible mi estadía en la carrera GRACIAS.

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	7
Justificación.....	13
Objetivos.....	14
Hipótesis.....	15
Materiales y métodos .....	16
Resultados.....	22
Discusión.....	28
Conclusiones.....	39
Perspectivas.....	40
Literatura citada.....	41

## Abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud	LPS	lipopolisacárido
AP	ácido palmítico	IL-33	Interleucina 33
AG	Ácido graso	ADA	Adenosín deaminasa
SM	Síndrome metabólico	XOR	Xantina oxidasa
AGS	Ácido graso saturado	AU	ácido úrico
TA	Tejido adiposo	rtPCR	reacción en cadena de la polimerasa tiempo real

## Resumen

La sobrealimentación en México es un problema que ha desencadenado que más del 70% de la población sufra obesidad. Esta sobrealimentación se ha asociado principalmente con la ingesta excesiva de azúcares y más recientemente al consumo de aceite vegetal. Los aceites vegetales en su mayoría están compuestos por ácido palmítico (AP), que es un ácido graso saturado que se encuentra en la mayoría de los alimentos industrializados, ya que se utiliza como aditivo o estabilizante en la comida “chatarra”, de igual forma se encuentra en gran parte de la comida tradicional mexicana, puesto que esta en su mayoría es preparada con abundante aceite y es justamente el derivado de la palma el segundo más consumido a nivel mundial. Sin embargo, la dieta alta en grasas no solamente ha desencadenado obesidad en la mayoría de la población mexicana, también ha acarreado consigo un conjunto de alteraciones metabólicas que clínicamente se engloban en el llamado síndrome metabólico (SM), estas son padecimientos como la hipertensión, dislipidemia y la resistencia a la insulina, estas alteraciones a su vez aumenta el riesgo de padecer diabetes mellitus 2 y alteraciones cardiovasculares, por lo cual es importante entender la importancia de la sobrealimentación en el origen del síndrome metabólico y sus complicaciones. Si bien se ha reportado la participación de la respuesta inflamatoria en dicho fenómeno, desconocemos cuál de todos los elementos de la respuesta inmunitaria participan en la fase temprana del SM. Además de lo anterior, otro mecanismo conocido que participa en el origen del SM es el estrés oxidativo, fenómeno que es favorecido por la sobrealimentación, que a su vez puede llevar también a la generación de un proceso inflamatorio crónico de bajo grado, que suele asociarse con un aumento en la síntesis de ácido úrico, una complicación del SM. Debido a lo anterior, el presente proyecto analizó la expresión de IL-33, la interleucina más reciente en la familia IL-1, como marcador de inflamación y de las enzimas XOR y ADA las principales enzimas reguladoras de la síntesis de AU, todo esto en el hígado de un modelo animal (*Oryctolagus cuniculus*) de sobrealimentación con 20% de ácido palmítico, para saber más acerca de los mecanismos de acción del proceso inflamatorio y estrés oxidativo que relacionan el consumo excesivo de grasas y el síndrome metabólico. Nuestros resultados mostraron que un consumo excesivo de AP (20%), promueve un

fenómeno inflamatorio que involucra un aumento en la expresión de IL-33, pero además modifica la síntesis de AU mediante cambios en la expresión de XOR y ADA.

## Introducción

La alimentación es parte fundamental de la vida del ser humano, pues el cuerpo y toda función metabólica dependen de la energía que extraemos de los alimentos. Esta energía le permite a la célula llevar a cabo las reacciones específicas y necesarias para mantener el equilibrio entre tomar energía del exterior y la síntesis de nuevas moléculas (Patiño J., 2006), sin embargo, este equilibrio puede no estar presente en diferentes circunstancias, por ejemplo, cuando el aumento en la ingesta de sustancias como azúcares y grasas causan complicaciones (OMS/FAO, 2002).

En una dieta basada en 2000 Kcal. diarias, la OMS recomienda, con el fin de prevenir enfermedades crónicas, que menos del 10% de estas calorías consumidas provengan de azúcares (OMS, 2016). No obstante, de acuerdo a datos mostrados por el Instituto Nacional de Salud, en México se consumen diariamente entre el 20 y 22% de las calorías, que provienen principalmente de la ingesta de bebidas azucaradas. Esto es un reflejo de los hábitos alimenticios de la población mexicana y como consecuencia en México, desde el año 2000, la diabetes es considerada la primera causa de muerte, con registros de hasta 83 000 decesos en el año 2010 (insp, 2023).

La sacarosa, mejor conocida como “azúcar de mesa”, es un disacárido conformado por fructosa y glucosa. Esta puede obtenerse a partir de la caña de azúcar o la miel de abeja, sin embargo, actualmente el azúcar de caña ha sido reemplazada en la industria por el jarabe de maíz alto en fructosa, este se adiciona a gran cantidad de productos de alto consumo humano, como: cereales, repostería, helados, dulces, jugos y bebidas gasificadas.

De acuerdo con la *American heart association* en 2014, las personas que consumen de 17 a 21% de calorías a partir de azúcares tienen un 38% de mayor riesgo de morir por una enfermedad cardiovascular con relación a quienes consumen menos del 10% recomendado por la OMS. Por otro lado, también se ha reportado que una dieta elevada en azúcares está asociada a problemas metabólicos como estrés oxidativo,



aumento de la lipogénesis *de novo*, dislipidemia, obesidad y resistencia a la insulina (Esquivel-Solís y Gómez-Salas, 2007).

Si bien las repercusiones del consumo desmedido de azúcares son alarmantes, la ingesta combinada de azúcares y grasas ha ido en aumento y con ellas una nueva problemática de salud pública a nivel mundial. Es relevante mencionar que el consumo y la producción de grasas se ha ido modificando con el paso del tiempo; en el pasado la ingesta de grasas de origen animal era mucho mayor (manteca, mantequilla, lácteos, aceite de pescado, etc.), no obstante, la demanda y el costo de adquisición fueron colocando a los aceites vegetales como la primera alternativa a nivel mundial (Chandrasekharan y Basiron, 2001). El aceite de palma es el segundo más consumido y producido en el mundo, y es extraído del fruto de la especie *Elaeis guineensis*, este es utilizado en la industria alimentaria para conservar, dar textura y sabor a los alimentos, por lo que es añadido a la gran mayoría de productos industrializados, desde las margarinas, frituras, pan, galletas, hasta pizza, los cereales, alimentos precocidos, lo que ha llevado a un consumo descontrolado.

La composición del aceite de palma es de un 40-50% en ácidos grasos saturados (AGS), siendo el principal el ácido palmítico (AP), este ácido graso está compuesto por una cadena de 16 átomos de carbono y además, es el ácido graso (AG) más abundante en el cuerpo humano. Su consumo está relacionado con el aumento de niveles plasmáticos de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son conocidas como grasas “malas”, ya que contribuyen en la formación de las placas de ateroma, así como la activación de la lipogénesis (Torrejón y Uauy, 2011). Por lo tanto el aceite de palma es reconocido por aumentar los niveles de colesterol en comparación con otros aceites vegetales, tomando en cuenta la cantidad en la que se consume así como factores ambientales y el historial clínico (Ye Sun *et al.*, 2015).

Debido al panorama actual donde los alimentos procesados aportan una gran cantidad de azúcares (fructosa) y grasas (ácido palmítico), la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial y cada año mueren, como mínimo 2.8 millones

de personas a causa de la obesidad o sobrepeso y enfermedades cardiovasculares. México es de los países con mayor obesidad en el mundo, al menos 70% de la población padece obesidad o sobrepeso (PROFECO, 2018), y se calcula que cada mexicano tiene un excedente energético diario de entre 700 y 800 Kcal (Hernández y Ortega, 2016). Como consecuencia ha ido aumentando cada año el porcentaje de personas con diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, y el número de eventos cardiovasculares registrados (ENSANUT, 2012-2018).

El fenómeno de la sobrealimentación es complejo y conduce al desarrollo de un desequilibrio entre la energía consumida y la gastada. Esta situación comúnmente provoca la acumulación anormal o excesiva de energía en forma de triglicéridos, que de manera común se almacenan en tejido adiposo (TA) (Blancas-Flores *et al.*, 2010).

El TA está compuesto por células, conocidas como adipocitos, que almacenan grasa en su citoplasma pero también de otras células tales como células endoteliales, pericitos, fibroblastos, mastocitos, y células inmunitarias (macrófagos y linfocitos T), todas estas células son altamente activas y funcionan como una unidad integradora que ejercen sus funciones autocrinas, endocrinas y paracrinas sobre el resto de los órganos. Esto se logra a través de la secreción de una gran variedad de enzimas, factores de crecimiento, hormonas y también a las llamadas citocinas ó interleucinas. Estas últimas son proteínas mediadoras de la inflamación, responsables de la comunicación intercelular que inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Las citocinas que intervienen en la modulación de las respuestas fisiológicas a cargo del tejido adiposo se denominan adipocitoquinas (Izaola *et al.*, 2015).

Durante periodos de sobrealimentación, cuando la grasa circundante es excesiva, los adipocitos aumentan tanto el número (hiperplasia) como en tamaño (hipertrofia) con el objetivo de almacenar y almacenar toda la grasa disponible. Este aumento de tamaño en los adipocitos requiere de mayor cantidad de oxígeno, el cual si no se obtiene conduce a hipoxia resultando en la muerte del adipocito. Este evento desencadena la

remodelación del TA, el cual al perder su capacidad de almacenamiento, inicia la movilización de macrófagos para eliminar las células muertas y “retirar” su contenido lipídico. Este proceso incrementa la presencia de los mediadores de la inflamación en el tejido, como: IL-6, IL-1b y TNF-alfa (Rodríguez López *et al.*, 2017). No obstante, recientemente se han relacionado otras citocinas con la sobrealimentación y el síndrome metabólico, por ejemplo la IL-33. Tradicionalmente, esta citocina se ha asociado con enfermedades “autoinflamatorias” como la artritis reumatoide, pero recientemente se ha reportado evidencia de que una posible relación entre esta citocina y la sobrealimentación (Miller *et al.*, 2008 - Nešić *et al.*, 2022).

La IL-33 es un ligando que se une al receptor T1/ ST2, perteneciente a la familia de las interleucinas 1 (IL-1), las cuales son interleucinas proinflamatorias. La unión del ligando con el receptor está a su vez mediada por un correceptor. Al establecer esta unión se inducen vías de señalización que resultan en la inflamación, así como en la liberación de más moléculas proinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-13 y el FNT- $\alpha$  (William *et al.*, 2008).

Por otro lado, en los últimos años se ha estudiado la relación entre el aumento del ácido úrico (AU) plasmático y desórdenes metabólicos asociados con la alimentación, como: la hipertensión, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa y la hipertrigliceridemia. Desde 1951 se ha asociado la elevación de AU con cardiopatía isquémica (Gertler MM *et al.*, 1951).

El ácido úrico (AU) es el producto final cuando se metabolizan las purinas (adenina y guanina). Este se encuentra intracelularmente en forma ionizada como urato ácido y debido a su solubilidad, se elimina mediante la orina (Aranguren *et al.*, 2015). Las vías de síntesis de AU están mediadas por enzimas que se encargan de catalizar las reacciones necesarias, ya sea retirando o agregando grupos químicos. En la vía seguida por la adenina, existen 2 enzimas claves en la conversión a AU. Por un lado, está la adenosina desaminasa (ADA), la cual se encarga de desaminar la adenosina. A la inosina posteriormente se le agrega un grupo fosfato y se le retira su ribosa-1-fosfato

para así pasar a hipoxantina. Por otro lado, la segunda enzima clave en el proceso llamada xantina oxidoreductasa (XOR), cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina al AU, esto mediante la suma del anión radical superóxido ( $O_2^-$ ) dando como resultado peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (imagen 1).

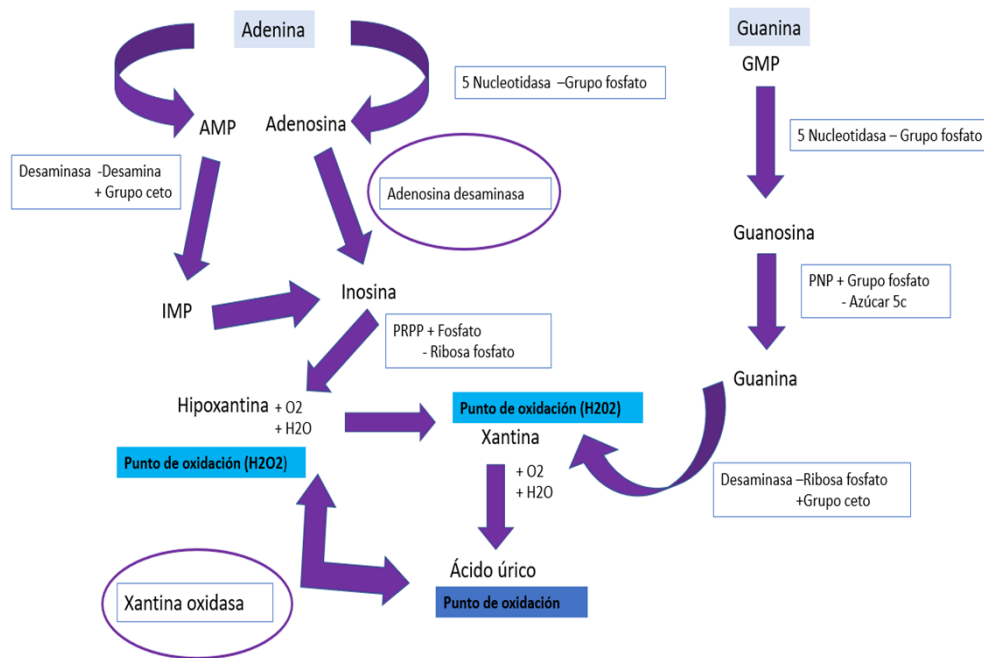


Imagen1. En la imagen se muestra la síntesis del AU.

El exceso de AU en sangre se conoce como hiperuricemia. Se consideran valores por encima de 6 mg/dl en mujeres y por encima de 7 mg/dl en hombres. Este fenómeno es un factor recurrente en pacientes con aterosclerosis acelerada, diabetes mellitus tipo 2, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, síndrome metabólico, enfermedad renal, pacientes con ingesta elevada de alcohol y en adolescentes obesos (Burns y Wortmann, 2021).

El consumo de fructosa genera directamente la síntesis de AU. Por lo tanto, es relevante estudiar el aumento de AU secundario al consumo de dietas ricas en este azúcar. Por ejemplo, en 2005 se llevó a cabo un modelo experimental de síndrome metabólico desarrollado en ratas, a las que se les administró fructosa al 60% en la dieta durante 6 meses. Al concluir el periodo, se observó aumento del ácido úrico en plasma, concomitante con el aumento de triglicéridos, hiperinsulinemia e hipertensión arterial.

Estos son fenómenos que también se observan en humanos que padecen el síndrome metabólico (Rosa F. *et al.*, 2005). Otro estudio realizado en el mismo año a cargo de Nakagawa y colaboradores, reveló que el aumento de AU debido a la dieta reduce los niveles de óxido nítrico (ON) endotelial. Este es un mediador clave de la acción de la insulina, ya que aumenta el flujo sanguíneo al músculo esquelético y mejora la absorción de glucosa. Por lo tanto al haber deficiencia de ON se desarrolla resistencia a la insulina, lo que lleva al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. A partir de esto, se desencadenan una serie de desórdenes metabólicos ya antes mencionados (Nakagawa *et al.*, 2006).

Dado que la obesidad es una epidemia presente y creciente en todo el mundo, y que los carbohidratos y las grasas son ingredientes comunes en la comida procesada, es importante realizar un estudio que examine la creciente ingesta de grasas y su relación con el AU. Se ha evidenciado anteriormente que la actividad de XOR en los hepatocitos se ve aumentada en los ratones alimentados con una dieta rica en grasa (41% y 60%) (Harmon *et al.*, 2019). Sin embargo, estos porcentajes excesivos podrían causar un daño evidente y posiblemente no permitan generar inferencias reales con respecto al consumo promedio de la población.

Por lo tanto, el presente trabajo presenta un panorama que busca aproximarse más a un consumo habitual, además de que el uso de ADA tampoco ha sido registrado previamente en este contexto. Todo esto contribuirá al estudio de una epidemia letal y silenciosa que normalmente se ha abordado desde el consumo de los azúcares.

El conejo es específicamente usado como organismo modelo debido al tamaño, la docilidad y su facilidad de manejo, esto aunado a sus hábitos alimenticios permite la obtención de muestras estadísticamente significativas sin ser excesivamente costoso (Russell y Schilling, 1976). El uso del hígado de conejo se debe a que es el modelo que cuenta con más similitudes con el metabolismo hepático del humano, por ejemplo, en la tasa del catabolismo de las lipoproteínas HDL, así como en la presencia de la proteína de transferencia de éster de colesterol, de la cual el plasma del conejo es rico (Meijer *et al.*, 1986).

## Justificación

La sobrealimentación actual generada por la industrialización de los alimentos y el estilo de vida sedentario tienen como consecuencia múltiples alteraciones en la salud, como la obesidad, la dislipidemia, diabetes mellitus 2, hipertensión y otras afecciones cardiovasculares, uno de los principales componentes en los alimentos es el ácido palmítico del cual se ha ido aumentando su consumo y al estar compuesto por lo menos en un 50% de AGS se ha reportado que su consumo aumenta los niveles de colesterol LDL en comparación con otros aceites vegetales (Ye Sun et al, 2015). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido de manera clara la participación de IL-33 en las primeras etapas del SM y la relación de la ingesta de AP en la síntesis de AU. Debido a lo anterior el presente trabajo evaluó la presencia de marcadores en un modelo experimental de 6 conejos NZ (*Oryctolagus cuniculus*) divididos en 2 grupos una mitad fue alimentada con una dieta adicionada con 20% de AP (+) y una sin AP (-), esto mediante la expresión transcripcional de IL-33, Adenosín deaminasa (ADA) y xantina oxidasa (XOR) mediante RT-qPCR.

## Objetivos

### **Objetivo general:**

Evaluar la expresión transcripcional de los genes IL-33, ADA y XOR en hígado de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) alimentados con una dieta enriquecida con 20% de ácido palmítico.

**Objetivos particulares:**

- Diseñar oligos específicos para las moléculas IL-33, ADA y XOR.
- Estandarización de los oligos mediante PCR punto final.
- Comparar la expresión transcripcional mediante RT-qPCR de IL-33, ADA y XOR entre los animales con y sin dieta adicionada con 20%.
- Interpretar estadísticamente los resultados obtenidos de la expresión transcripcional.



## **Hipótesis**

Habrà un cambio en la expresi3n transcripcional de los genes IL-33, ADA y XOR en los conejos alimentados con 20% de àcido palmítico en comparaci3n con los alimentados con una dieta sin grasas adicionales.

## Materiales y Método

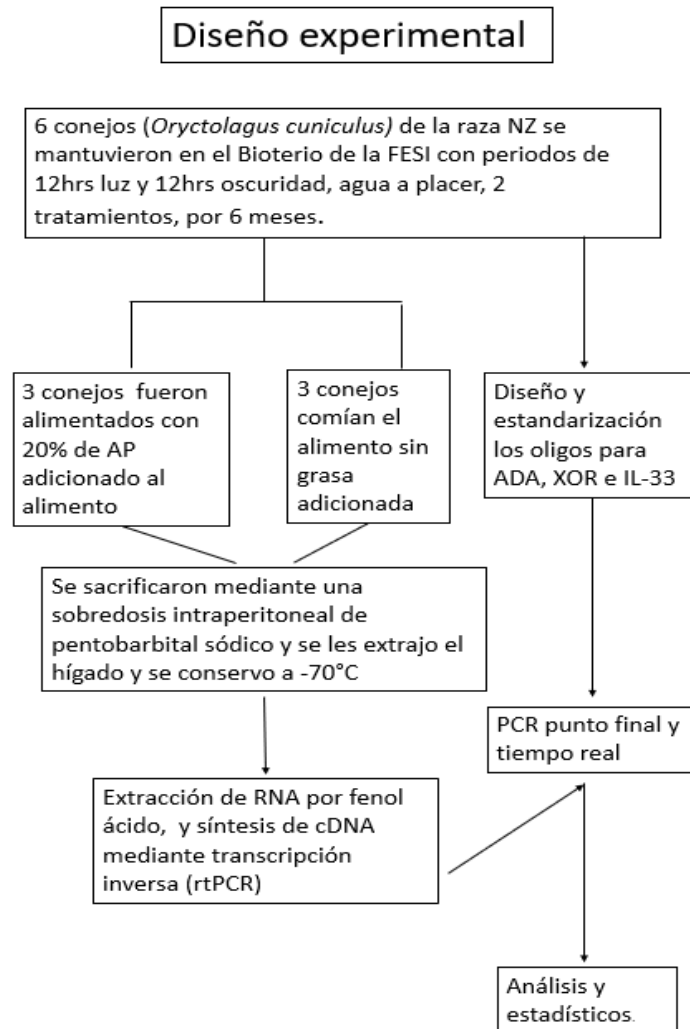


Imagen 2. Diseño experimental de las actividades realizadas

### **Animales de experimentación**

Se utilizaron seis conejos machos (*Oryctolagus cuniculus*) de la cepa NZ, con un mes de edad, provenientes de la granja de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Los animales se dividieron en dos

grupos experimentales, con y sin grasa, y se mantuvieron en el bioterio de la FESI durante seis meses. Se les proporcionó servicios de limpieza y agua ad libitum, y su dieta, preparada previamente en el laboratorio, incluía conejina adicionada con un 20% de ácido palmítico (AP).

Después de seis meses de experimentación, los conejos fueron sacrificados mediante una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (3 ml/1 kg). Previamente anestesiados y una vez que se comprobaba la ausencia de reflejos; palpebral, córnea y respuesta muscular a estímulos dolorosos, se procedió a extraer el hígado y se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> para asegurar su adecuada congelación con nitrógeno líquido. Los fragmentos se etiquetaron y se conservaron a -70°C hasta el momento de la experimentación.

### **Diseño de oligos**

Para el diseño de los oligonucleótidos correspondientes a las moléculas IL-33, ADA y XOR, se utilizó la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las secuencias de los RNAs mensajeros de dichas moléculas. Posteriormente, se comprobaron sus características termodinámicas mediante la herramienta Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), asegurándonos de que se cumplieran los siguientes criterios para garantizar la efectividad de los oligonucleótidos:

- Contenido de citosinas y guaninas del 50%
- Temperatura de disociación de 60C°
- No favorecer la formación de horquillas (hairpin)
- No favorecer la formación de homodímeros y heterodímeros

A continuación, con la ayuda del sitio web BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), realizamos una comprobación teórica del funcionamiento de los oligonucleótidos en cuanto a su especificidad y al tamaño de sus productos. Los oligonucleótidos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

## Oligos

GEN	FW	RV
ADA	CCA GGA AGT CTG AGT CAG	CAC GCC GAG GTG TGT
XOR	GCG CTG AGC CTA CGA TGA	CGA ATT CCT CTG GTT TGA AC
IL-33	AAG CAG GCA GGA CTG AGA	TCTTACCATCAACGCCATC

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados

### **Estandarización de oligos**

Para la evaluación práctica del funcionamiento de los oligos se realizaron reacciones PCR punto final en un modelo de inflamación, el cual fue hígado de conejo inducido con lipopolisacárido (LPS) (Romero e Iregui, 2010).

### **Extracción de RNA**

Para la extracción del RNA se descongeló un 1 cm<sup>3</sup> de hígado de cada uno de los organismos de estudio y se procedió a la extracción mediante un protocolo de fenol ácido (véase en el anexo 1).

### **Transcripción reversa**

El RNA extraído del tejido se cuantificó usando un nano espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo scientific), una vez se garantizó la calidad y cantidad del RNA este fue usado como molde para la síntesis de la copia complementaria del DNA (cDNA) mediante una reverso transcripción (rt PCR), esto con ayuda del kit de invitrogen que contiene la enzima retrotranscriptasa M-MLV (28025013), la descripción de la técnica en anexo 2.

### **PCR punto final**

Una vez obtenido el cDNA se amplificaron las secuencias de las tres moléculas mediante PCR punto final, para lo cual se empleó 10 µl de master mix, el cual es un kit de promega que contiene la enzima Taq polimerasa (M7822), así como 1 µl de Forward (Fw) y Reverse (Rv) de cada uno de los oligos, 1 µl de cDNA y H<sub>2</sub>O DEPC necesaria para completar a 20 µl en total, ya que todo se pipetea en el tubo para microcentrífuga, este se metió al termociclador con las siguientes especificaciones del programa de corrida:

- Desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos, 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 la amplificación de las moléculas se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % utilizando la escalera molecular de 1kb, el acomodo de los pocillos se dispuso de la siguiente manera:

- pocillo 1- la escalera de 100 pb.
- pocillo 2 control (-).
- pocillo 3 control (+) con cdna.

### **PCR de tiempo real**

Posteriormente, se realizaron las pruebas de PCR en tiempo real por triplicado para cada gen tanto para cada tejido con grasa y tejido control, además de realizar los controles negativos correspondientes, en todas las reacciones se empleó el kit de Applied Biosystems que contiene un Master Mix 2x con Sybr Green (4309155), además de los Fw y Rv de cada oligo diseñado, cDNA y H<sub>2</sub>O DEPC. El gen utilizado para control interno fue Beta actina.

Las condiciones de amplificación fueron iguales en todos para las tres moléculas:

- 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 más las del control interno Beta actina, mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (J. Livak y D. Schmittgen, 2001).



## Resultados

### Estandarización de los oligonucleótidos por RT-PCR punto final

Una vez que se completó el diseño in vitro de los oligos correspondientes a nuestros genes de interés, se procedió a evaluarlos de manera experimental. Para este propósito, nos apoyamos en un modelo de inflamación aguda que se logró a través de la inoculación de una dosis de lipopolisacárido (LPS) en el hígado del conejo utilizado. Se sabe que el LPS es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y, cuando se libera de la membrana, interactúa con las proteínas y los receptores CD14, TLR4 y MD-2 del sistema inmunitario, lo que desencadena una respuesta inflamatoria (Hurtado e Iregui, 2010).

Tras finalizar este modelo animal, se utilizó el RNA extraído del hígado de estos animales para obtener cDNA y, posteriormente, realizar pruebas PCR con los tres pares de oligos diseñados. A continuación, se presentan las migraciones electroforéticas en gel para las tres moléculas, lo que confirma su correcta amplificación (Figura 3).

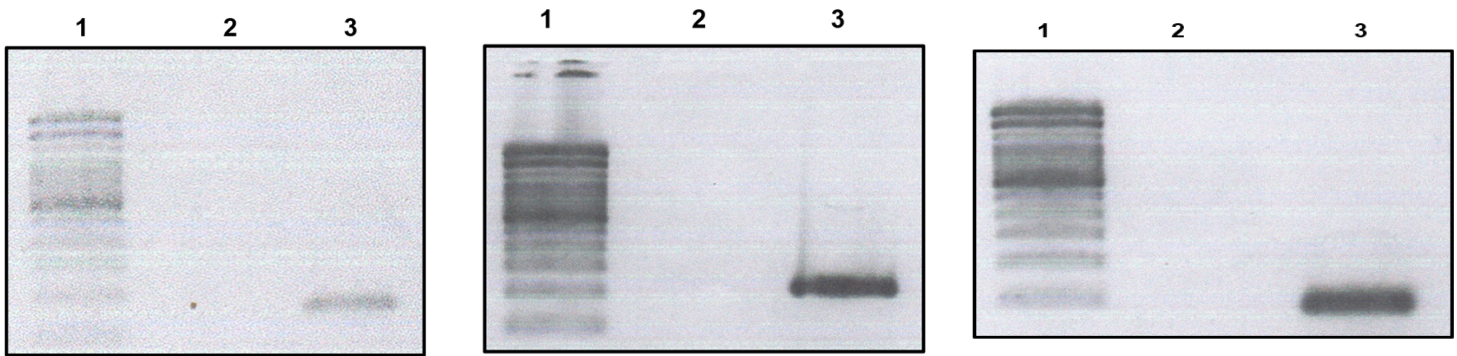


Figura 3. Amplificación de geles (agarosa 1.5%) correspondientes a IL-33, ADA Y XOR, en ese orden respectivamente, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100pb, el carril 2 el control (-), y el carril 3 la amplificación de las 3 moléculas, correspondiente a lo esperado.

### Estandarización de los oligos mediante RT-PCR tiempo real

Después de confirmar que los oligos diseñados generaban productos únicos y del tamaño adecuado según el diseño, se procedió a la amplificación mediante RT-PCR en tiempo real. Se realizó una curva de disociación con el fin de identificar un solo pico

para cada par de oligos, utilizando la temperatura referida en la PCR convencional. En la Figura 4 se muestran ejemplos de las curvas de disociación para los oligos diseñados para el gen IL-33 (Figura 4A), ADA (Figura 4B) y XOR (Figura 4C).

### Análisis de expresión de IL-33, ADA y XOR

Una vez estandarizados los oligonucleótidos tanto por RT-PCR convencional como en tiempo real, se extrajo el RNA de los hígados de los organismos experimentales y controles. A partir de estas muestras, se sintetizó cDNA utilizando 1 mg de RNA de excelente calidad. Este cDNA se utilizó para realizar un análisis semicuantitativo de la concentración de mRNA para cada uno de los genes de interés y el gen de control mediante RT-PCR en tiempo real.

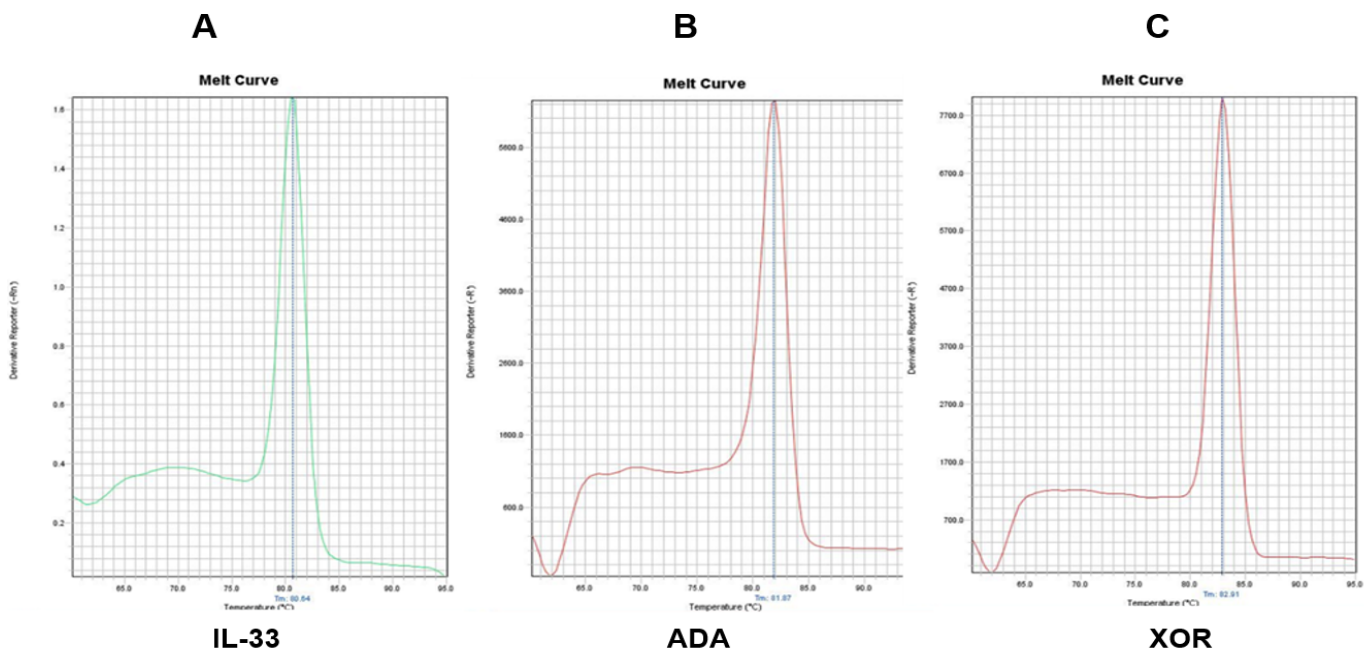


Figura 4. Curvas de melting de las moléculas de estudio en el modelo de 20% de AP adicionado, obtenidas a partir de reacciones qPCR. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de delta CT comparando la expresión del gen blanco en relación con el gen *housekeeping* (Beta actina) en la muestra de los conejos sobrealimentados contra la del conejo control (Livak y Schmittgen, 2001).



El análisis mostró que los conejos sobrealimentados con 20% de ácido palmítico (AP) expresaron en promedio 50 veces más IL-33 en sus hígados en comparación con los conejos no sobrealimentados (Figura 5).

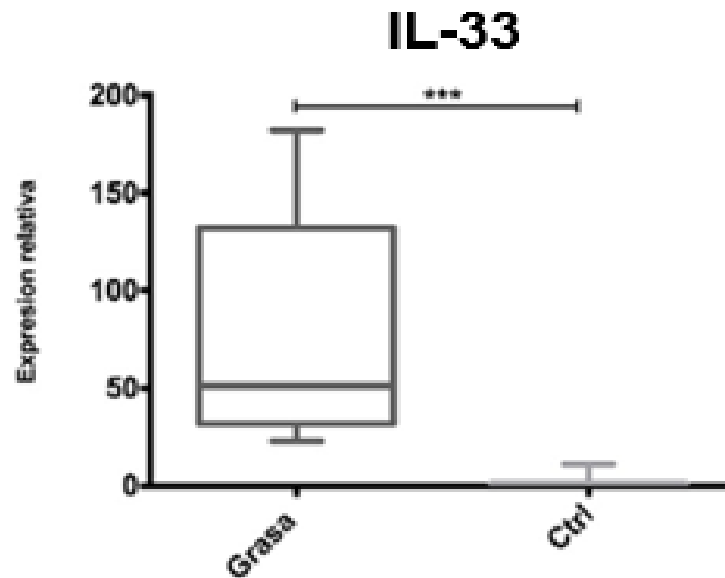


Figura 5. Expresión relativa de IL-33 en los dos tratamientos, dónde se puede observar que IL-33 se expresa 40 veces más en comparación del tratamiento con grasa.

En el caso de las enzimas relacionadas con la producción de ácido úrico (AU) encontramos que ADA se expresa .5% más en el hígado de los conejos sobrealimentados en comparación a los animales con una dieta estándar (Figura 6), mientras que XOR incrementa su expresión 20 veces en los animales sobrealimentados en comparación a los individuos control.

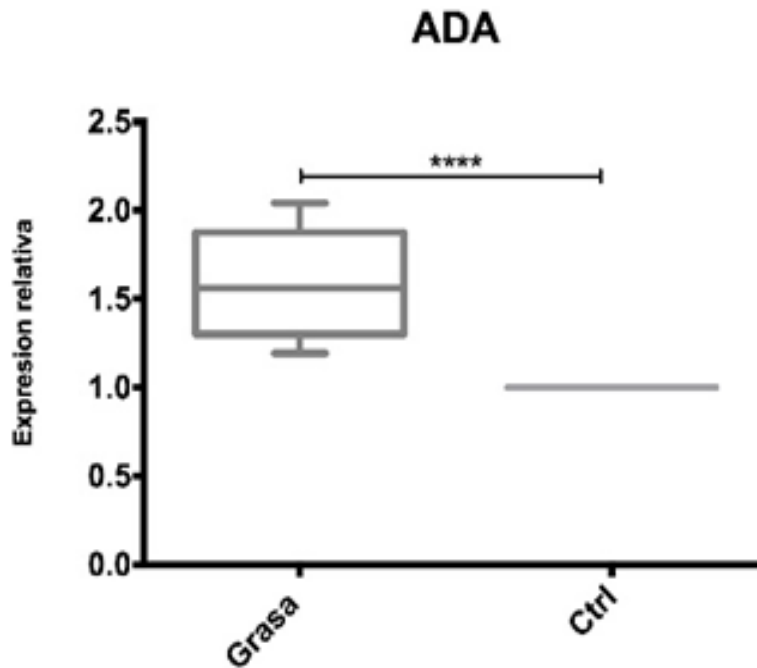


Figura 6. Expresión relativa de ADA aumentada .5 veces más en el tratamiento (+) con AP.

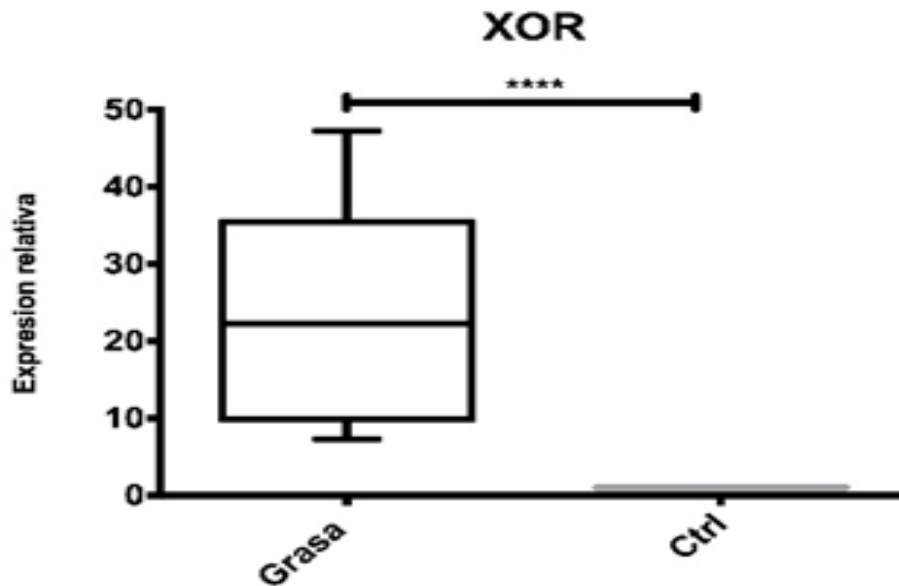


Figura 7. Expresión relativa de XOR, siendo la molécula relacionada con AU, más aumentada en el tratamiento con AP (+).

## Discusión

Los estudios de investigación actuales han demostrado el papel importante de la sobrealimentación en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. En particular, se ha evidenciado que el ácido palmítico (AP) aumenta los triglicéridos y el colesterol en la sangre de pacientes con obesidad, lo cual genera resistencia a la insulina (RI). La RI se asocia estrechamente con la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico. Además, el aumento del AP en la sangre también induce una respuesta inflamatoria (Joshi-Barve *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Sigrist-Flores y colaboradores en 2019, reveló que la ingesta crónica de AP (3%) propiciaba su acumulación en las células del hígado, además del desarrollo de inflamación de bajo grado caracterizada por la regulación ascendente de TNF- $\alpha$ , IL-13 e IL-18. Sin embargo, hasta ahora, los informes sobre el efecto del ácido palmítico en la respuesta inflamatoria no han abarcado todo el espectro de la respuesta inmunitaria, incluyendo el posible mecanismo de acción de la IL-33, una interleucina perteneciente a la familia de las IL-1 (citocinas proinflamatorias). Además, no se ha informado hasta ahora de modificaciones en el metabolismo del ácido úrico asociadas con el consumo de ácido palmítico, a pesar de la relación clínica existente entre la alteración en dicho metabolismo, el síndrome metabólico y la sobrealimentación (Lancina *et al.*, 2013).

Nuestro estudio es uno de los primeros en investigar la relación entre la sobrealimentación con ácidos grasos saturados como el ácido palmítico y la actividad inmunitaria asociada a la IL-33. Específicamente, analizamos la expresión transcripcional del mRNA de esta interleucina en el hígado de conejos sometidos a sobrealimentación crónica con un 20% de ácido palmítico.

Nuestros resultados muestran un claro aumento de hasta 40 veces en la concentración de mRNA de IL-33 en el hígado de los conejos sometidos al tratamiento con un 20% de AP en comparación con la dieta regular (Figura 5). Esto nos indica que hay un proceso

inflamatorio en el hígado debido a la ingesta de AP, ya que IL-33 pertenece a la familia de las interleucinas 1, y estas son reconocidas por estimular la respuesta inflamatoria la cual al verse modificada pueden alterar la respuesta del huésped a un desafío inflamatorio (Dinarello, 1994)

IL-33 es una citocina que se expresa de manera constitutiva en el núcleo de varias células, incluyendo las células endoteliales de los vasos sanguíneos, las células epiteliales y las células del sistema inmunitario. Se libera como una alarmina en respuesta a la lesión o necrosis de las células de barrera, y promueve la activación del sistema inmunitario innato, lo que permite combatir patógenos a través de la inflamación. Sin embargo, cuando se libera de manera excesiva, esta inflamación puede volverse crónica y provocar daño tisular (Liew et al., 2016).

La activación de la señalización inflamatoria intracelular, conlleva la actividad de complejos enzimáticos que permiten la translocación al núcleo de factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB), lo que promueve la expresión génica de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de adhesión (Dunne y O'Neill, 2003)

Otros factores de transcripción que intervienen son la quinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK-1) e IKK (imagen3), estos interrumpen en la señalización de la insulina y promueve su resistencia (Jorquera *et al.*, 2021). Es importante mencionar que los elementos de la respuesta inmune además de inducir inflamación también generan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que a su vez prolonga la inflamación (Yang *et al.*, 2013).

Tanto IL-33 como el resto de citocinas requieren unirse a receptores para ejercer sus funciones, un ejemplo son los tipo Toll (TLR), los cuales son proteínas transmembrana que se encuentran en las células del sistema inmunitario así como en las células endoteliales y epiteliales de los tejidos. En el caso de los ácidos grasos saturados como el AP, se ha demostrado que su mecanismo de acción está mediado por el receptor TLR4, lo cual promueve una respuesta inflamatoria que está relacionada con problemas

en la absorción de glucosa y el metabolismo de los ácidos grasos. Se ha observado que la eliminación del gen TLR4 en ratones tiene un efecto protector contra la inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas, lo que indica el papel causal desempeñado por TLR4 en los cambios metabólicos asociados con el consumo excesivo de alimentos y la obesidad (Roger y Calder, 2018).

Otra serie de receptores que también actúan como sensores y mediadores de la inflamación son los tipo NOD, estos conforman un conjunto de proteínas intracelulares conocido como inflamasomas, que responden a señales exógenas mediadas por PAMPs ó a señales endógenas mediadas por DAMPs. El inflamasoma NLRP3, que es el inflamasoma mejor caracterizado, se ha implicado en el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus 2, su activación permite el ensamblaje de un complejo que activa a la caspasa-1 que a su vez activa a los precursores de IL-1b, IL-18 e IL-33, favoreciendo la secreción de estas citocinas (proinflamatorias) hacia el espacio extracelular (Jorquera *et al.*, 2021). Uno de los estímulos que activan este inflamasoma son las EROs, por lo que su relación con la obesidad es ampliamente estudiada, esto debido a que en estados de sobre alimentación, los adipocitos sufren hipoxia lo que libera EROs, provocando a su vez una polarización en el fenotipo de los macrófagos circundantes, pasando de un estado antiinflamatorio M2, que predomina en condiciones de equilibrio energético negativo, a un estado más proinflamatorio M1 (imagen 4) (Lumeng *et al.*, 2007)

Es debido a este ciclo de inflamación que la obesidad puede considerarse una forma de inflamación epidémica que predispone a otras formas de inflamación (Nathan C., 2008). La inflamación crónica es caracterizada por la presencia en plasma tanto de linfocitos T CD8 +, linfocitos T CD4 + así como macrófagos, lo cual está críticamente involucrado en el inicio y mantenimiento de esta inflamación, debido a la constante producción de citocinas proinflamatorias, quimioquinas y leptina en la TA (Kiran *et al.*, 2021). Esta inflamación puede durar períodos prolongados de varios meses a años, y se considera de bajo grado ya que no causa disfunción en el tejido que la presenta (Pahwa R.,

2022). Y aunque la respuesta inflamatoria crónica o sistémica se origina principalmente en el tejido adiposo, se ha descubierto que otros tejidos, como el hígado, el páncreas, el hipotálamo y el músculo esquelético, también están involucrados en la inflamación sistémica. Se cree que la inflamación crónica de bajo grado que se desarrolla en el tejido adiposo en la obesidad, se transfiere a estos otros tejidos a través de la presencia de mediadores inflamatorios activos en la sangre (Cai *et al.*, 2005).

En el caso del hígado, este cuenta con células especializadas llamadas células de Kupffer, que son sus propios macrófagos. Estas células desempeñan un papel importante en la producción de EROs, además de ser las principales productoras de citocinas en el hígado. Cuando se acumulan grasas y se produce daño en los hepatocitos, se intensifica la inflamación y se genera estrés oxidativo debido a la liberación de EROs, lo cual en este caso puede llevar a la disfunción mitocondrial (Lagunes *et al.*, 2019). Estos procesos son posibles causantes de enfermedades hepáticas como la enfermedad de hígado graso no alcohólico, la esteatosis, la fibrosis y la cirrosis hepática (Quimís-Cantos, 2020).

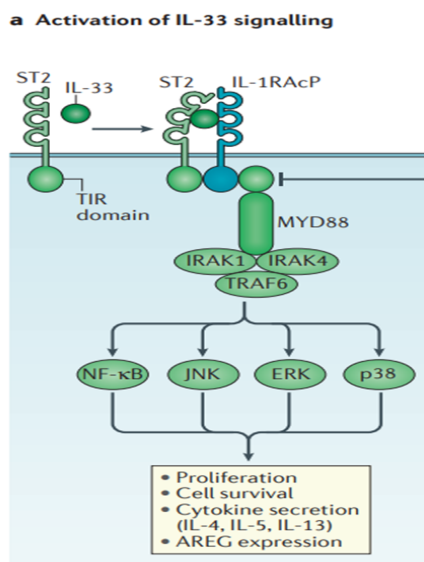


Imagen 3. Señalización de IL-33 (Liew *et al.*, 2016).

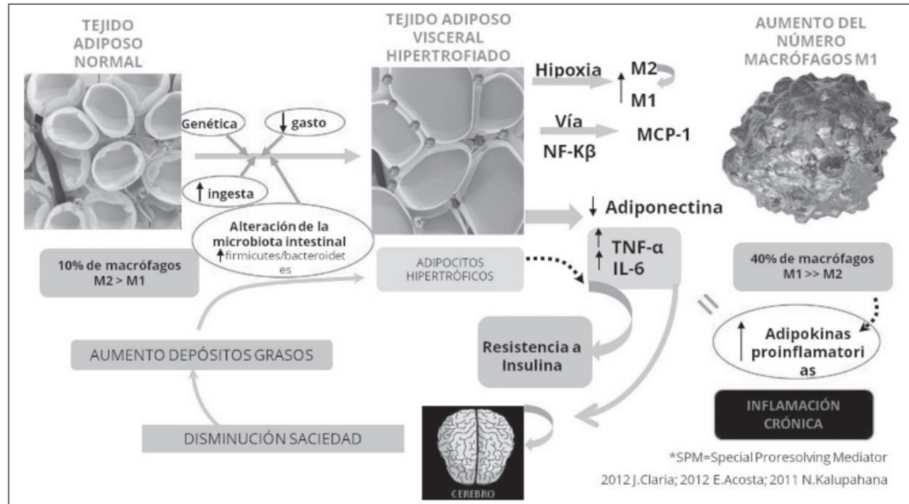


Imagen 4. Se observa el tejido adiposo sano con un bajo porcentaje de macrófagos M2 mayormente antiinflamatorios, pero diversos factores como la genética y el estilo de vida más ↑ en el consumo de grasas resulta ↑ en la cantidad y el tamaño de los adipocitos causando hipoxia, ↑ así la cantidad de macrófagos M1 (proinflamatorios), lo cual termina modificando el metabolismo de la persona ↓ la saciedad y desencadenando diversos padecimientos como diabetes 2, hígado graso o alguna afección cardíaca (Izaola et al., 2015).

Sin embargo, el papel de IL-33 en la obesidad parece ser distinto al de otras interleucinas inflamatorias. Mientras que estas últimas estimulan la inflamación, IL-33 podría ser una respuesta del cuerpo al daño causado por la acumulación de grasa en el hígado. De hecho, IL-33 se considera una citocina de doble función, ya que sus efectos dependen del entorno tisular. Puede actuar como una citocina antiinflamatoria (Yang *et al.*, 2011).

Un estudio realizado por Hasan *et al.*, en 2014 determinó los niveles séricos de IL-33 en sujetos diabéticos y no diabéticos, y correlacionó estos niveles con parámetros clínicos y metabólicos. Se encontró que los niveles bajos de IL-33 están relacionados con un alto índice de masa corporal, ya que IL-33 disminuye la expresión de resistina (un mediador responsable del desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2). También conduce a la acumulación de células Th2 protectoras y sus citocinas antiinflamatorias, promueve la polarización de los macrófagos residentes hacia un fenotipo protector alternativamente activado M2, y reduce el almacenamiento de lípidos y la expresión de genes asociados con la lipogénesis y la adipogénesis. Como resultado, los niveles bajos de IL-33 pueden aumentar el riesgo de desarrollar

aterosclerosis y resistencia a la insulina. Además, otros estudios han demostrado que el tratamiento de cultivos de tejido adiposo con IL-33 induce la producción de citocinas Th2 y reduce la expresión de genes involucrados en la adipogénesis y la lipogénesis (Miller *et al.*, 2008).

Estos trabajos, junto con nuestro estudio, revelan que la inflamación es un proceso complejo y en constante descubrimiento. El papel de IL-33 en la regulación de la inflamación y su relación con el metabolismo del cuerpo son fundamentales para comprender los múltiples trastornos asociados. En nuestro estudio, observamos una modificación en el metabolismo del hígado de los conejos tratados con 20% de AP, ya que se encontró una sobreexpresión de IL-33, que podría servir como marcador para predecir el estado inflamatorio en etapas tempranas del síndrome metabólico o como un regulador en la resolución de la inflamación.

En cuanto a las enzimas ADA y XOR, nuestro estudio reportó un aumento estadísticamente significativo en el tratamiento con 20% de AP, como se observa en las figuras 7 y 8. Esto indica que existe una modificación en la síntesis de AU debido a la ingesta de grasas. Estudios anteriores ya han relacionado los niveles de AU con la obesidad, y es importante tener en cuenta el papel del exceso de consumo energético (grasas y carbohidratos) en la inflamación y el estrés oxidativo, que a su vez aumenta la producción de AU. Esto convierte a uno de los principales antioxidantes del cuerpo en prooxidante, lo que puede llevar a disfunción endotelial (Kuzkaya *et al.*, 2005).

El hígado desempeña un papel fundamental en la síntesis del ácido úrico (AU) debido a la actividad de la enzima fosforribosil pirofosfato (PRPP) sintetasa. Esta enzima es responsable de añadir fosfato y nitrógeno a una molécula de ribosa, formando el compuesto precursor de purinas conocido como PRPP. A partir del PRPP, se produce el inosinmonofosfato (IMP), que puede convertirse tanto en Guanosin Monofosfato (GMP) como en Adenosín Monofosfato (AMP), dependiendo de las necesidades metabólicas. Alternativamente, el IMP puede seguir la vía de degradación de las purinas,



transformándose en inosina, hipoxantina, xantina y finalmente en ácido úrico. El ácido úrico se ioniza rápidamente a urato (imagen 6) (Marulanda *et al.*, 2016).

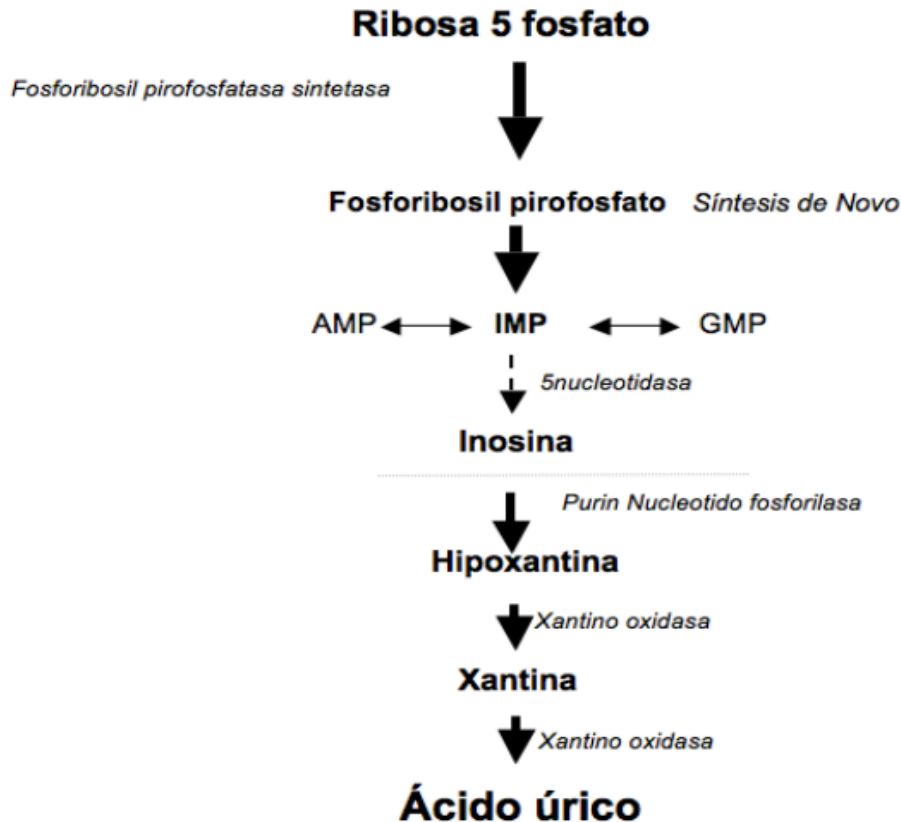


Imagen 6. Fuente endógena de bases purinas y síntesis a partir de estas de AU.

La capacidad prooxidante del ácido úrico (AU) se debe a la liberación de radicales libres (RL) por parte de la enzima XOR durante su síntesis. Estos RL son moléculas que tienen la capacidad de unirse a otras moléculas y aumentar su estado oxidativo. Por lo tanto, el aumento en la síntesis de AU conlleva un incremento en la oxidación celular. Algunas moléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos presentes en las membranas celulares, son más susceptibles a la acción de los antioxidantes, lo que resulta en modificaciones estructurales y funcionales de las células, conocidas como estrés oxidativo (Paredes y Roca, 2002). Este estrés oxidativo puede provocar disfunción endotelial e inflamación vascular crónica de bajo grado (Ming Jin *et al.*, 2012).

Entonces, ¿por qué el consumo de grasas aumenta la síntesis de AU? Según un estudio realizado en 2013 en adipocitos de ratones obesos, los cambios que ocurren en las células debido a la acumulación de grasa (hiperplasia e hipertrofia) resultan en un estado de hipoxia, donde la célula no recibe suficiente oxígeno. Esto lleva a un aumento en la producción de XOR, lo que genera estrés oxidativo, inflamación y, a su vez, un incremento en la síntesis de AU (Tsushima *et al.*, 2013), como se observó en este estudio donde XOR fue la molécula más aumentada en la dieta con un 20% de AP agregado.

Otra posible razón está relacionada con la lipogénesis y/o la lipólisis. En el caso de la lipogénesis, se ha descrito que el tejido adiposo obeso se caracteriza por una síntesis activa de ácidos grasos, la cual está estrechamente vinculada a la síntesis de purinas a través de la activación de la vía de las pentosas fosfato (Leyva *et al.*, 1998). La presencia abundante de XOR resulta en un aumento en la síntesis de AU (Matsuura *et al.*, 1989). Además, la evidencia sugiere que la activación de la lipólisis en los adipocitos, estimulada hormonalmente, puede estar relacionada con el recambio de AMPc. La hidrólisis del AMPc produce AMP, que es el primer sustrato en la reacción catabólica de producción de purinas. Por lo tanto, la lipólisis también podría estar asociada con la producción de AU en los tejidos adiposos obesos. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar todos estos posibles mecanismos descritos.

Aunque la relación entre el consumo de grasas y el metabolismo del AU aún no está completamente clara, este estudio proporciona evidencia utilizando el conejo como modelo de que una dieta con un 20% de AP añadido aumenta la síntesis de AU en el hígado. Esto puede conducir a un aumento en el estrés oxidativo en las células hepáticas, así como a un incremento en la inflamación, lo cual puede dar lugar a daño en los órganos y al desarrollo de diversas enfermedades.

## Conclusiones

- El consumo de una dieta enriquecida con un 20% de ácido palmítico en conejos induce un aumento en la expresión de IL-33 en el hígado, lo cual podría estar implicado en la inflamación crónica característica de enfermedades metabólicas. Estos hallazgos sugieren que IL-33 puede desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria hepática asociada con la sobrealimentación de ácido palmítico.
- La expresión transcripcional de las enzimas ADA y XOR se encontró aumentada en el hígado de conejos alimentados con una dieta adicionada con un 20% de ácido palmítico. Este aumento en la expresión de ADA y XOR puede estar relacionado con el incremento del estrés oxidativo en el hígado, lo cual sugiere una posible asociación a largo plazo entre el consumo de ácido palmítico y la síntesis de ácido úrico.
- Estos hallazgos proporcionan evidencia de los efectos perjudiciales de la dieta enriquecida con ácido palmítico en el hígado, incluyendo la posible participación de IL-33 en la inflamación crónica y el aumento de la expresión de ADA y XOR asociados al estrés oxidativo y la síntesis de ácido úrico. Estos resultados respaldan la importancia de considerar los efectos metabólicos y la calidad de la dieta en la prevención y el manejo de enfermedades crónicas relacionadas con el metabolismo. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y las implicaciones clínicas de estos hallazgos.

## Perspectivas

- Los resultados de este estudio resaltan la importancia de continuar investigando el papel de IL-33 en la inflamación hepática asociada con la sobrealimentación de ácido palmítico. Se necesitan estudios adicionales para comprender los mecanismos exactos por los cuales IL-33 interviene en la respuesta inflamatoria y cómo se relaciona con otras citocinas proinflamatorias en el contexto de enfermedades metabólicas.
- Es fundamental profundizar en la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de ADA y XOR en el hígado en respuesta a la dieta rica en ácido palmítico. Investigaciones futuras podrían explorar los mediadores y vías de señalización involucrados en la modulación de estas enzimas y su relación con el estrés oxidativo y el metabolismo de ácido úrico.
- Además, se requieren estudios longitudinales para evaluar los efectos a largo plazo de la dieta enriquecida con ácido palmítico en la función hepática y el desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas. Esto ayudaría a comprender mejor las implicaciones clínicas de los cambios observados en la expresión de IL-33, ADA y XOR, y su relación con la inflamación crónica y el estrés oxidativo.
- Por último, considerando la relevancia de la dieta en el desarrollo de enfermedades metabólicas, es fundamental promover intervenciones nutricionales y estrategias de estilo de vida saludable para prevenir y manejar estas enfermedades. Estos hallazgos resaltan la importancia de limitar la ingesta de ácido palmítico y fomentar una alimentación equilibrada y rica en nutrientes para preservar la función hepática y prevenir la inflamación crónica asociada con enfermedades metabólicas.

## Literatura citada

- ❖ Aranguren, F., Morales, M., Paganti, L., Russomando, S., Salazar, M., Traversa, M., Valle, D., Wassermann, E., & Elbert, A. (2015). Aspectos metabólicos y complicaciones de la hiperuricemia. *Nefrología, diálisis y trasplante*, 35, 140–152.
- ❖ American heart association *Azúcares añadidos*. (Dakota del Norte). [www.corazon.org](http://www.corazon.org). Recuperado el 12 de mayo de 2023 de <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/sugar/added-sugars>
- ❖ Blancas-Flores, G. (s. f.). La obesidad como un proceso inflamatorio. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462010000200002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462010000200002)
- ❖ Bravo-Bravo A. y Canarte Alcívar J. (2017). MYD88.
- ❖ Burns, C. y Wortmann, R. (2021). *Capítulo 431e: Trastornos del metabolismo de las purinas y pirimidinas*.
- ❖ Cai, D., Yuan, M., Frantz, DF, Meléndez, PA, Hansen, L., Lee, J. y Shoelson, SE (2005). Resistencia a la insulina local y sistémica resultante de la activación hepática de IKK-beta y NF-kappaB. *Medicina natural* , 11 (2), 183–190. <https://doi.org/10.1038/nm1166>
- ❖ Chandrasekharan, N. y Basiron, Y. (2001). Aceite de palma en la salud y la nutrición humana. El aceite de palma en la nutrición y la salud humana. *PALMAS*, 22 (3), 72–82.
- ❖ Dinarello, C.A. (1994). The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 517–531.
- ❖ Dunne, A. y Neill, LA (2003). La superfamilia del receptor de interleucina-1/receptor Toll Like: transducción de señales durante la inflamación y la defensa del huésped. *ciencia STKE*.
- ❖ Esquivel-Solís, V., & Gómez-Salas, G. (2007). Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *AMC*, 49 (4), 198–202.
- ❖ Gertler, MM, Driskell, MM, Bland, EF, Garn, SM, Lerman, J., Levine, SA, Sprague, HB y White, PD (1951). Aspectos clínicos de la enfermedad coronaria; un análisis de 100 casos en pacientes de 23 a 40 años de edad con infarto de miocardio. *Revista de la Asociación Médica Estadounidense* , 146 (14), 1291–1295. <https://doi.org/10.1001/jama.1951.03670140017005>
- ❖ Harmon, DB, Mandler, WK, Sipula, IJ, Dedousis, N., Lewis, SE, Eckels, JT, Du, J., Wang, Y., Huckestein, BR, Pagano, PJ, Cifuentes-Pagano, E., Homanics, GE, Van't Erve, TJ, Stefanovic-Racic, M., Jurczak, MJ, O'Doherty, RM y Kelley, EE (2019). La ablación específica de hepatocitos o la inhibición de la xantina oxidoreductasa en todo el cuerpo en ratones corrige la hiperuricemia sistémica inducida por la obesidad sin mejorar las anomalías metabólicas. *Diabetes* , 68 (6), 1221–1229. <https://doi.org/10.2337/db18-1198>
- ❖ Hasan, A., Al-Ghimlas, F., Warsame, S. et al. La IL-33 se asocia negativamente con el IMC y confiere un perfil lipídico/metabólico protector en sujetos no

- diabéticos pero no diabéticos. *BMC Immunol* 15 , 19 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-15-19>
- ❖ Hernández, J., & Ortega, J. (2016). *El perfil general del excedente nutrimental en México en el periodo 1990-2013: un enfoque a partir del suministro energético de macronutrientes y grupos de alimentos* .
  - ❖ Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., y Shimomura, I. (2007). Hipoxia del tejido adiposo en la obesidad y su impacto en la desregulación de adipocitoquinas. *Diabetes* , 56 (4), 901–911. <https://doi.org/10.2337/db06-0911>
  - ❖ Hotamisligil, GS (2006). Inflamación y trastornos metabólicos. *Naturaleza* , 444 (7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
  - ❖ Hurtado, R. e Iregui, S. (2010). El Lipopolisacárido. *Rev Med Vet* , 37–45.
  - ❖ INEGI. (2018). Obesidad [Conjunto de datos]. En Encuesta Nacional de Salud y Nutrición . [archivo:///C:/Usuarios/Propietario/Descargas/ensanut2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](archivo:///C:/Usuarios/Propietario/Descargas/ensanut2018_presentacion_resultados.pdf)
  - ❖ Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). *El consumo de azúcar en México y la nueva directriz de la OMS para su reducción global* . <https://www.insp.mx/epppo/blog/3609-consumo-azucar-mexico-nueva-directriz-oms.html>
  - ❖ Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). *DIABETES EN MÉXICO* . <https://www.insp.mx/avisos/3652-diabetes-en-mexico.html>.
  - ❖ Izaola, O., de Luis, D., Sajoux, I., Domingo, JC, & Vidal, M. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutrición hospitalaria: órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral* , 31 (6), 2352–2358. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829>
  - ❖ Johnson, RJ, Feig, DI, Herrera-Acosta, J. y Kang, D.-H. (2005). Resurrección del ácido úrico como factor de riesgo causal en la hipertensión arterial esencial. *Hipertensión* , 45 (1), 18–20. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000150785.39055.e8>
  - ❖ Jorquera, G., Russell, J., Monsálves-Álvarez, M., Cruz, G., Valladares-Ide, D., Basualto-Alarcón, C., Barrientos, G., Estrada, M., & Llanos, P. (2021). NLRP3 Inflammasome: Potential Role in Obesity Related Low-Grade Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3254. <https://doi.org/10.3390/ijms22063254>
  - ❖ Joshi-Barve, S., Barve, SS, Amancherla, K., Gobejishvili, L., Hill, D., Cave, M., Hote, P. y McClain, CJ (2007). El ácido palmítico induce la producción de citoquinas proinflamatorias interleucinas de los hepatocitos. *Hepatology (Baltimore, Maryland)* , 46 (3), 823–830. <https://doi.org/10.1002/hep.21752>.
  - ❖ Kiran, S., Kumar, V., Murphy, E. Á., Enós, R. T., y Singh, U. P. (2021). Las células T CD8 + inducidas por una dieta alta en grasas en el tejido adiposo median en los macrófagos para mantener la inflamación crónica de bajo grado. *Frente. Immunol.Sec. Citoquinas y Mediadores Solubles en Inmunidad*, Volumen 12(2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680944>
  - ❖ Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, DG y Dikalov, S. (2005). Interacciones de peroxinitrito con ácido úrico en presencia de ascorbato y tioles: implicaciones

- para desacoplar la óxido nítrico sintasa endotelial. *Farmacología bioquímica* , 70 (3), 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.009>
- ❖ Lagunes, S., Perea-Martínez, A., Lara-Campos, AG, González, -, & Valadez, AL (2019). Impacto de la dislipidemia en la enfermedad. grasa hepática no alcohólica. *Rev.SalJal • Año* , 6-8.
  - ❖ García-Osorio, V., Hernández-López, MA, Solís-Aguilar, DC, De La Paz-Morales, C., & De La Osa-Busto, M. (2019). *Impacto de la dislipidemia en la enfermedad hepática grasa no alcohólica*.
  - ❖ Lancina, A., Portela, P., Vázquez-Martul, D., López, D., Sánchez, J., Aller, M., Lamas, C., y Rey, D. (2013). *Síndrome metabólico y litiasis urinaria de ácido úrico*.
  - ❖ Lee, JY, Sohn, KH, Rhee, SH y Hwang, D. (2001). Los ácidos grasos saturados, pero no los ácidos grasos insaturados, inducen la expresión de ciclooxigenasa-2 mediada a través del receptor tipo Toll 4. *J. Biol. Chem* , 276 , 16683–16689.
  - ❖ Leyva, F., Wingrove, CS, Godsland, IF y Stevenson, JC (1998). La vía glicolítica hacia la enfermedad coronaria: una hipótesis. *Metabolismo: Clínico y Experimental* , 47 (6), 657–662. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(98\)90026-9](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(98)90026-9).
  - ❖ Liew, FY, Girard, J.-P. y Turnquist, HR (2016). Interleucina-33 en la salud y la enfermedad. *Reseñas de la naturaleza. Inmunología* , 16 (11), 676–689. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.95>
  - ❖ Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
  - ❖ Kenneth, L. y Thomas, S. (2001). *Análisis de datos de expresión génica relativa mediante PCR cuantitativa en tiempo real y el método 2 Delta CTs*.
  - ❖ Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175-184. <https://doi.org/10.1172/jci29881>
  - ❖ Matsubara, K., Matsuzawa, Y., Jiao, S., Takama, T., Kubo, M. y Tarui, S. (1989). Relación entre la hipertrigliceridemia y la producción de ácido úrico en la gota primaria. *Metabolismo: Clínico y Experimental*, 38 (7), 698–701. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(89\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(89)90110-8)
  - ❖ Marulanda, I., López Gómez, L., y Sosa Sánchez, L. (1967). Consenso venezolano de ácido úrico como factor de riesgo cardiovascular. *CONSEJOS Imagen y Comunicación* .
  - ❖ Matsuura, F., Yamashita, S., Nakamura, T., Nishida, M., Nozaki, S., Funahashi, T. y Matsuzawa, Y. (1998). Efecto de la acumulación de grasa visceral sobre el metabolismo del ácido úrico en sujetos obesos masculinos: la obesidad de la grasa visceral está más estrechamente relacionada con la sobreproducción de ácido úrico que la obesidad de la grasa subcutánea. *Metabolismo: Clínico y Experimental* , 47 (8), 929–933. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(98\)90346-8](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(98)90346-8)
  - ❖ Meijer, G. W., Geelen, M. J., Van Herck, H., Mullink, J. W. M. A., Van Zutphen, L., & Beynen, A. C. (1990). A method for perfusion of the isolated rabbit liver through the portal vein and the hepatic artery in a recirculating system. *Laboratory Animals*, 24(1), 14-24. <https://doi.org/10.1258/002367790780890329>

- ❖ Miller, AM, Asquith, DL, Hueber, AJ, Anderson, LA, Holmes, WM, McKenzie, AN, Xu, D., Sattar, N., McInnes, IB y Liew, FY (2010). La interleucina-33 induce efectos protectores en la inflamación del tejido adiposo durante la obesidad en ratones. *Investigación de circulación*, 107 (5), 650–658. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218867>
- ❖ Miller, AM, Xu, D., Asquith, DL, Denby, L., Li, Y., Sattar, N., Baker, AH, McInnes, IB y Liew, FY (2008). IL-33 reduce el desarrollo de aterosclerosis. *Revista de Medicina Experimental*, 205 (2), 339–346. <https://doi.org/10.1084/jem.20071868>
- ❖ Milovanovic, M., Volarevic, V., Radosavljevic, G., Jovanovic, I., Pejnovic, N., Arsenijevic, N. y Lukic, ML (2012). Eje IL-33/ST2 en inflamación e inmunopatología. *Investigación inmunológica*, 52 (1–2), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8283-9>
- ❖ Nakagawa, T., Kang, D.-H., Feig, D., Sánchez-Lozada, LG, Srinivas, TR, Sautin, Y., Ejaz, AA, Segal, M. y Johnson, RJ (2006). Descubriendo el ácido úrico: un factor antiguo con significado recientemente encontrado en enfermedades renales y cardiovasculares. *Riñón Internacional*, 69 (10), 1722–1725. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000391>
- ❖ Nathan, C. (2008). Epidemic Inflammation: Pondering Obesity. *Molecular Medicine*, 14(7-8), 485-492. <https://doi.org/10.2119/2008-00038.nathan>
- ❖ Nešić, J., Ljujic, B., Rosic, V., Djukic, A., Rosic, M., Petrović, I., Zornic, N., Jovanović, I., Petrovic, S., & Djukic, S. (2022). Adiponectin and Interleukin-33: Possible Early Markers of Metabolic Syndrome. *Journal of Clinical Medicine*, 12(1), 132. <https://doi.org/10.3390/jcm12010132>
- ❖ Ogbera AO, Azenabor AO. Hyperuricemia and the metabolic syndrome in type 2 DM. *Diabetol Metab Syndr*. 2010; 2:24
- ❖ *La OMS recomienda aplicar medidas en todo el mundo para reducir el consumo de bebidas azucaradas y sus consecuencias para la salud*. 2016. (Dakota del Norte). Quién.int. Recuperado el 12 de mayo de 2023, de <https://www.who.int/es/news/item/11-10-2016-who-urges-global-action-to-curtail-consumption-and-health-impacts-of-Bebidas-azucaradas>
- ❖ OMS/FAO. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una consulta de expertos conjunta OMS/FAO (2002). <https://www.who.int/publications/i/item/924120916X>
- ❖ Paredes S. y Fernández, R. (2002). *Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular*. 21, 96–100.
- ❖ *Patiño Restrepo, JF (2006). Metabolismo, Nutrición y Shock . Editorial Médica Panamericana.*
- ❖ Pahwa R, Goyal A, Jialal I. Inflamación crónica. (2022). *Inflamación crónica*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- ❖ Procuraduría Federal del Consumidor. (Dakota del Norte). *Obesidad y sobrepeso. Menos kilos, más vida*. Gob.Mx. Recuperado el 12 de mayo de 2023, de <https://www.gob.mx/profeco/documentos/obesidad-y-sobrepeso-menos-kilos-mas-vida?state=published>
- ❖ Quimís-Cantos, Y. (2020). Nutrición en el hígado graso no alcohólico. Polo del Conocimiento: revista científica. *Revista Científica*, 5.



- ❖ Rogero, M. y Calder, P. (2018). Obesidad, inflamación, receptor tipo toll 4 y ácidos grasos. *Nutrientes* , 10 (4), 432. <https://doi.org/10.3390/nu10040432>
- ❖ Rosa, F., Vásquez, J., Antequera, R., & Romero-Vecchione, E. (2005). Hiperreactividad cardiovascular a la estimulación de la región anteroventral del tercer ventrículo de ratas con síndrome metabólico experimental. *Rev Soc Esp Cardiol*, 58.
- ❖ Russell, Robert J. y Paul W. Schilling. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: el conejo . 2da. edición Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1976. Impreso.
- ❖ Sigrist-Flores, S. C., Ponciano-Gómez, A., Pedroza-Gonzalez, A., Gallardo-Ortiz, I. A., Villalobos-Molina, R., Pardo-Vázquez, J., Saucedo-Campos, A. D., Jiménez-Flores, R., & Méndez-Cruz, A. R. (2019). Chronic intake of moderate fat-enriched diet induces fatty liver and low-grade inflammation without obesity in rabbits. *Chemico-Biological Interactions*, 300, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.004>
- ❖ Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, TK, Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman , DM, Bazán, JF y Kastelein, RA (2005). IL-33, una citocina similar a la interleucina-1 que emite señales a través de la proteína ST2 relacionada con el receptor de IL-1 e induce citocinas asociadas a células T colaboradoras de tipo 2. *Inmunidad* , 23 (5), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.inmune.2005.09.015>.
- ❖ Tan, BL y Norhaizan, ME (2019). Efecto de las dietas ricas en grasas sobre el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria celular y la función cognitiva. *Nutrients*, 11 (11), 2579. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/nu11112579>
- ❖ Torrejón, C., y Uauy, R. (2011). Calidad de la grasa, arteriosclerosis y enfermedad coronaria: efectos de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans. *RevMed Chile* , 139 (7), 924–931.
- ❖ Tsushimahitoshi, Y., Yoshihiro, N., Hideaki, T., Ryohei, N., Hirofumi, S., Takashi, N., Kenta, S., Keiichiro, K., Hiroyuki, I., Mizuho, T., Norikazu, T., Tohru, M. y Shimomura, F. (2013). Secreción de ácido úrico del tejido adiposo y su aumento en la obesidad. *JBC* , 288 (38), 27138–27149.
- ❖ William, A., Palmer, G. y Gabay, C. (2008). Familias de citocinas IL-1, IL-18 e IL-33. *Revisiones inmunológicas*, 208.
- ❖ William, G., Soares, M. y Ernestânia, V. (2008). El ácido úrico como modulador del metabolismo de la glucosa y los lípidos. *Biochimie* , 116 , 17–23.
- ❖ Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, OJ, Chen, X. y Lu, B. ( 2011). IL-33 se sinergiza con la señalización de TCR e IL-12 para promover la función efectora de las células T CD8(?). *Eur J. Immunol* , 41 (11), 3351–3360.
- ❖ Yen S., Neelakantan, N., Wu, Y., Lote-Oke, R., Pan, A. y van Dam, RM (2015). El consumo de aceite de palma aumenta el colesterol LDL en comparación con los aceites vegetales bajos en grasas saturadas en un metanálisis de ensayos clínicos. *Diario de Nutrición*, 145 (7), 1549–1558. <https://doi.org/10.3945/jn.115.210575>

- ❖ Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive Oxygen Species in the Immune System. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249-270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

## Anexo 1 de técnicas

### Extracción de RNA por fenol ácido

Materiales	Sustancias	Equipo
Cajas Petri bisturí Tubos Eppendorf de 6µl Micropipetas de 2, 200 y 1000µl Gradilla	Buffer AE DEPC SDS al 20% Fenol ácido Cloroformo isoamílico Acetato de magnesio 3M alcoholes Agua inmaculada	Vórtex Calentador Centrifuga de 13000 rpm

Tabla 2. Material y equipo utilizado en la extracción de RNA

Una vez descongelada la muestra de hígado se lavó para quitar el exceso de sangre con 500 µl de Buffer AE y se procedió a picar la muestra con ayuda de un bisturí, posteriormente se transfirió a un tubo eppendorf con 500 µl de Buffer AE más 5 µl de DEPC.

En un segundo tubo limpio se colocó 400 µl de fenol ácido y 20 µl SDS al 20%, este se colocó a 65°C durante 5 minutos y posterior a esto se vertió la muestra del primer tubo al contenido del segundo tubo, ya mezclado se colocó en el vórtex por 30 segundos y una vez más se puso a 65°C por 5 minutos (este paso se repitió dos veces).

Posteriormente, se colocó el tubo a -70°C durante 5 minutos y una vez pasados los 5 minutos se procedió a su centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos, una vez terminada la centrifugación se obtuvieron 2 fases en el tubo de las cuales se recuperó en un tubo nuevo la fase acuosa, tras recupera la fase acuosa se le agregó al mismo tubo 500 µl de cloroformo isoamílico y se puso 30 segundos en vórtex, esto se volvió a centrifugar por 5 minutos a 130000 rpm.

Terminada la centrifugación se recuperó una vez más la fase acuosa en un nuevo tubo, esta vez se cuantificó el volumen obtenido y se precipitó agregando acetato de magnesio al 3M (.1 volúmenes) y etanol al 75% (2.5 volúmenes), una vez agregados se dejó por 30 minutos a -70°C.

Transcurridos los 30 minutos en frío se centrifugó por 15 minutos a 130000 rpm, una vez pasada la centrifugación se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol al 100%, se dejó sacar y por último la pastilla de RNA obtenido se suspendió con 30 µl de agua DEPC y se conservó a -70°C.

## Anexo 2

### Pasos para la obtención de cDNA

- Desnaturalización del RNA a 65 °C por 5 minutos en un tubo para microcentrífuga con:
  - 1 µg de RNA
  - 1 µg Random hexamers
  - 5 µg dNTPs
  - 5 µg H<sub>2</sub>O DEPC
- Amplificación a 50°C por 90 minutos agregando al tubo:
  - 4 µl 5X First-Strand Buffer
  - 1 µg DDT's
  - 1 µg Rnasa OUT
  - 1 µg enzima reverso transcriptasa
  - Completar 20 µl con H<sub>2</sub>O DEPC