



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLI-
INSATURADOS OMEGA 3 SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS EN ADOLESCENTES OBESOS CON
RESISTENCIA A LA INSULINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DIANA PAMELA GODINEZ VILLANUEVA



México, D. F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**
VOCAL: **Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia**
SECRETARIO: **Profesor: Maricela Rodríguez Cruz**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**
2° SUPLENTE: **Profesor: Julio César Martínez Álvarez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN. HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

ASESOR DEL TEMA: MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ

Firma del Tutor

SUSTENTANTE: DIANA PAMELA GODÍNEZ VILLANUEVA

Firma del Alumno

La investigación de esta tesis fue financiada por la Coordinación de Investigación Médica en Salud, IMSS, México (Grant #FIS/IMSS/PROT/PRIO/11/014).

Contenido

Resumen	5
Capítulo 1	7
Función y fisiología del Tejido Adiposo	7
Obesidad.	7
Tejido Adiposo	7
Tipos de Tejido Adiposo Blanco	9
Función adiposa.....	10
Tejido Adiposo como órgano endocrino	11
Obesidad.....	12
Capítulo 2	15
Inflamación	15
Citocinas Proinflamatorias.....	17
Capítulo 3	21
Resistencia a la Insulina	21
Vías moleculares proinflamatorias generadoras de resistencia a la insulina en la obesidad	21
Capítulo 4	25
Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3	25
Fuentes alimenticias de los ácidos grasos poli-insaturados omega 3.....	27
Mecanismos de acción anti-inflamatoria de los ácidos grasos poli-insaturados omega 3	27
Antecedentes.....	30
Planteamiento del Problema	35
Justificación	36
Objetivo	37
Objetivo particular	37
Hipótesis.....	38
Material y métodos	39
Población de estudio.....	39
Tipo de estudio	39
Ubicación del estudio.....	40
Criterios de inclusión.....	40

Criterios de eliminación.....	40
Consideraciones éticas.....	41
Diagrama de flujo.....	42
Procedimientos.....	43
Composición del Suplemento	44
Expresión de RNAm de citocinas proinflamatorias y de marcadores de inflamación CCR2 y MMD	45
Extracción del RNA total	45
Pureza y Cuantificación del RNA total.....	46
Integridad del RNA.....	47
Síntesis de cDNA	47
PCR punto final.....	48
Cuantificación del RNAm por qRT-PCR	49
Análisis Estadístico.....	51
Resultados.....	52
Expresión del RNAm de las moléculas inflamatorias en leucocitos de adolescentes obesos.....	54
Discusión de Resultados	66
Conclusiones	73
Bibliografía.....	74
Anexos	79
I. Extracción de RNA total a partir de leucocitos (Método Chomczynski) ⁴⁵	79
II Síntesis de la primera cadena de cDNA	80
III PCR Punto Final.....	81
IV PCR en tiempo real.....	82

Resumen

Antecedentes. La obesidad es una enfermedad caracterizada por un desequilibrio entre un aumento en el consumo calórico y una disminución de la actividad física. Este padecimiento ha incrementado de manera importante en nuestro país afectando cada vez con mayor prevalencia a adolescentes entre 11 y 19 años. Durante el desarrollo de este estado patológico, el tejido adiposo blanco aumenta en tamaño y número por lo que comienza a reclutar macrófagos y monocitos en el sitio de inflamación. Esta condición se conoce como inflamación crónica de grado leve en la cual los macrófagos participan secretando citocinas proinflamatorias (IL1, TNF- α , IL6). Dado que la obesidad es un estado de inflamación que predispone al desarrollo de diferentes enfermedades, existe una condición previa a éstas, entre las que se incluyen la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina puede desarrollarse debido a la acción de moléculas inflamatorias como son las citocinas proinflamatorias. Un tratamiento viable para contrarrestar el estado inflamatorio es el uso de agentes con actividad anti-inflamatoria como los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3, ya que regulan la expresión de factores de transcripción maestros de los procesos inflamatorios como NF κ B.

Objetivo: Determinar el efecto de la suplementación con ácidos grasos poli-insaturados omega 3 sobre la expresión de genes inflamatorios en adolescentes obesos con resistencia a la insulina.

Metodología: Se estudiaron 30 adolescentes obesos (percentila >95 del IMC) entre 11 y 18 años de edad con resistencia a la insulina (HOMA>3.18). Los sujetos se suplementaron con 1.2 g/d de ácidos grasos omega 3 (16 sujetos) o aceite de girasol/día como placebo (14 sujetos) durante 3 meses. Se analizó la expresión de genes de inflamación IL-1, TNF- α , IL-6, CCR2 y MMD mediante PCR en tiempo real en el RNA total de leucocitos de sangre periférica a los 0 y 3 meses de suplementación. Los valores de expresión se compararon entre los tiempos intergrupo con una *t-Student* e intragrupo con *t-Pareada*, ($P<0.05$).

Resultados: Se observó una menor expresión de CCR2 y MMD ($P<0.05$) en el grupo suplementado con ácidos grasos omega 3, respecto al placebo a los 3 meses de suplementación. En el grupo placebo, la expresión de CCR2 incrementó ($P<0.05$) y MMD mostró una tendencia a aumentar ($P=0.07$) a los 3 meses de suplementación. La expresión de IL-1 y MMD disminuyó ($P<0.05$) a los 3 meses de suplementación respecto al inicio del tratamiento en el grupo suplementado con ácidos grasos omega 3. No se observaron cambios en la expresión del RNAm de CCR2, IL-6 y TNF- α .

Conclusión: Los ácidos grasos omega 3 (1.2g/d) disminuyen la inflamación a través de reducir la expresión de los genes inflamatorios IL-1, MMD y CCR2 de leucocitos de adolescentes obesos con resistencia a la insulina a los 3 meses de suplementación.

Capítulo 1

- Función y fisiología del Tejido Adiposo
 - Obesidad.
-

Tejido Adiposo

El tejido adiposo es un tejido conectivo que está compuesto principalmente de adipocitos que constituyen más del 90% del volumen del tejido, el resto lo constituyen diferentes tipos de células como fibroblastos, macrófagos, células del estroma vascular, monocitos y preadipocitos¹ (Figura 1). Los capilares se distribuyen ampliamente en el tejido adiposo y cada célula adiposa se encuentra en contacto con al menos un capilar para realizar el intercambio con metabolitos y hormonas.² Entre el nacimiento y la pubertad, el tejido adiposo crece rápidamente en tamaño y número, pero es hasta después de la pubertad que el número de adipocitos se mantiene constante.²

Los adipocitos son diferenciados a partir de células mesenquimales. Una característica de los adipocitos es la presencia de gotas grandes de lípidos en el citosol, donde el exceso de energía es almacenado en forma de triacilgliceroles (TG). Durante las etapas tempranas de diferenciación del adipocito, sus células precursoras (preadipocitos) experimentan cambios morfológicos que incluyen un aumento en el volumen citoplasmático, biogénesis mitocondrial, formación de gotas de lípidos y aparición de abundante retículo endoplásmico. En un adipocito

maduro, las gotas de lípidos ocupan mayoritariamente gran parte del espacio intracelular y el retículo endoplásmico desaparece. Estos cambios subcelulares requieren remodelación citoplasmática durante la adipogénesis.²

El tejido adiposo se clasifica en dos categorías, tejido adiposo blanco y tejido adiposo café, los cuales tienen diferentes funciones.

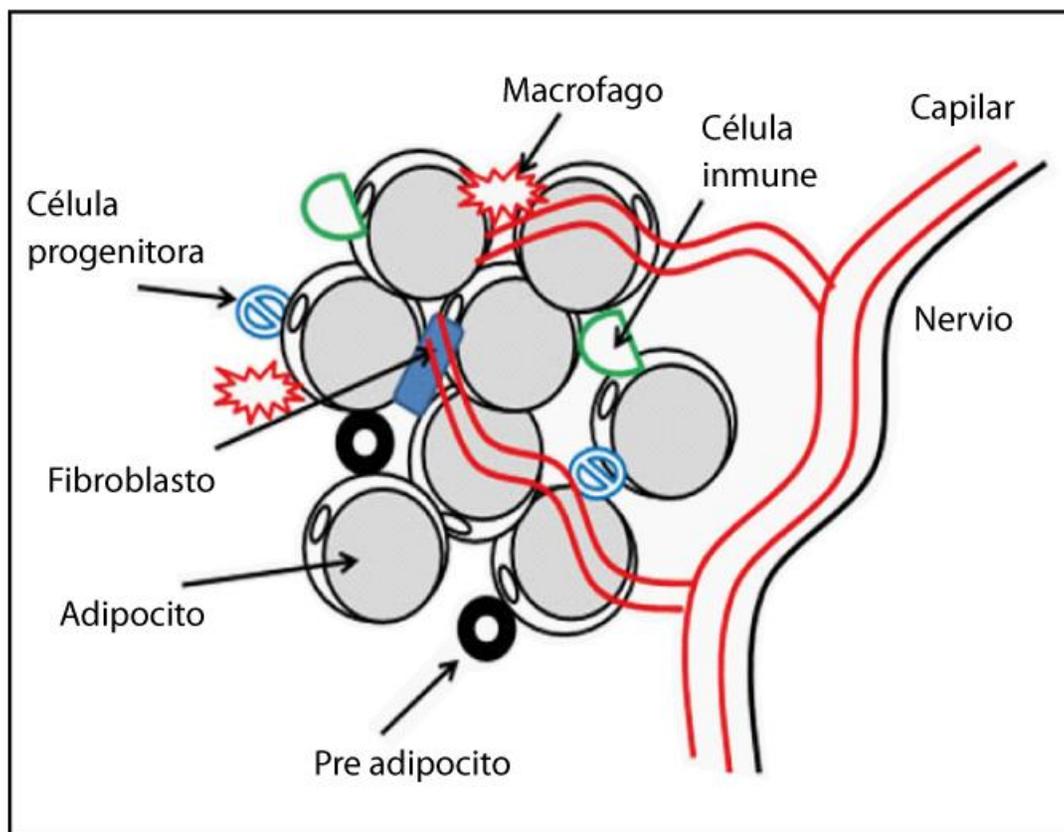


Figura 1: Composición celular del tejido adiposo blanco. El tejido adiposo está formado por el sistema vascular, preadipocitos, adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células progenitoras.³

- **Tipos de Tejido Adiposo Blanco**

Durante mucho tiempo se consideró al tejido adiposo simplemente como un depósito de grasa, para el suministro de energía que permite mantener cierta autonomía energética en situaciones de falta prolongada de alimento. El conocimiento de esta función pasiva fue cambiando en los últimos años al descubrirse que el tejido adiposo no es uniforme. Diversos estudios han comprobado que el tejido adiposo participa de modo muy activo y trascendental en el control del balance energético e incluso como órgano endocrino.⁴

El tejido adiposo blanco contiene la mayor parte de las reservas grasas del organismo, tiene un aspecto blanco-amarillento y se distribuye esencialmente en dos regiones⁴ a) tejido adiposo subcutáneo y b) tejido adiposo visceral.

La localización y distribución del tejido adiposo puede explicar sus diferentes funciones. El tejido adiposo subcutáneo está localizado por debajo de la piel y es responsable de la distinta composición corporal de hombres y mujeres. Este tipo de tejido adiposo contribuye a la regulación de temperatura.⁴ El tejido adiposo visceral llena los espacios entre los órganos y los protege manteniéndolos en la posición apropiada. La distribución de la masa grasa está relacionada a las diferencias regionales y al proceso lipolítico¹. La grasa visceral y el tamaño del adipocito se han asociado positivamente con resistencia a la insulina periférica y hepática. Se ha demostrado que cuando se remueve la masa grasa visceral, pero no la subcutánea, la sensibilidad a la insulina mejora, lo que sugiere que el tejido adiposo subcutáneo no contribuye a las anomalías metabólicas,

particularmente cuando éste tipo de tejido graso aumenta. Así, un incremento en la masa grasa abdominal, de tipo visceral, parece ser importante para la patogénesis no solo para la resistencia a la insulina, sino también de dislipidemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión y riesgos cardiovasculares.⁴ La mayor parte del tejido adiposo visceral está localizado en la cavidad abdominal en forma de depósitos lipídicos, los cuales rodean órganos como el reproductivo, el riñón, o el intestino.⁴

- **Función adiposa**

El tejido adiposo aísla al cuerpo y protege a los órganos internos. Sin embargo, la función más importante del tejido adiposo blanco es mantener el balance de energía.² Esto se debe a que la grasa del tejido adiposo proporciona una manera más eficiente de energía (9 kcal/g) comparado con la energía que proporcionan las proteínas y los hidratos de carbono (4 kcal/g).²

Cuando el consumo de energía a partir de alimentos, excede la demanda de energía por el cuerpo, el exceso de energía se convierte en lípidos en el hígado, que luego son transportados en forma de quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a los adipocitos. Estos lípidos son hidrolizados por la lipoproteína lipasa a ácidos grasos libres (FFA) para ser incorporados y almacenados en los adipocitos. Estos FFA junto con los ácidos grasos sintetizados en los adipocitos, son esterificados con glicerol para formar triacilgliceroles (TG), los cuales después son almacenados dentro de los depósitos de grasa.²

Tejido Adiposo como órgano endocrino

El tejido adiposo blanco también tiene una importante función como célula secretora, es por ello que expresa y secreta una variedad de moléculas llamadas adipocinas, involucradas en regular la homeostasis de energía en todo el cuerpo.² Las adipocinas pueden tener actividad de manera local (autócrina y/o parácrina) y a nivel sistémico (endocrina).⁵

La fisiología normal del tejido adiposo implica su expansión como un proceso adaptativo pasivo. Sin embargo, existen límites de capacidad de expansión y en la capacidad de acumular cualquier exceso de nutrientes, el cual puede ser un factor determinante en el comienzo de comorbilidades asociadas con la obesidad. Cuando el tejido adiposo llega a un límite máximo de expansión, los adipocitos pierden cierta funcionalidad y comienzan a expresar de manera anormal algunas moléculas.⁶ (Figura 2). El tamaño de un adipocito puede ampliar su diámetro de 30 μm a 230 μm , siendo la expansión del tejido adiposo el resultado del incremento en el volumen del adipocito, tal y como se observa en la obesidad.² De manera que la hipertrofia de los adipocitos observada en la obesidad está asociada con un funcionamiento anormal de la función endocrina.⁷

Desde que se reconoce al tejido adiposo como un órgano endocrino, ha incrementado el interés por estudiar las moléculas que secreta y que puedan contribuir a las alteraciones metabólicas y hemodinámicas observadas en la obesidad y la resistencia a la insulina.⁵

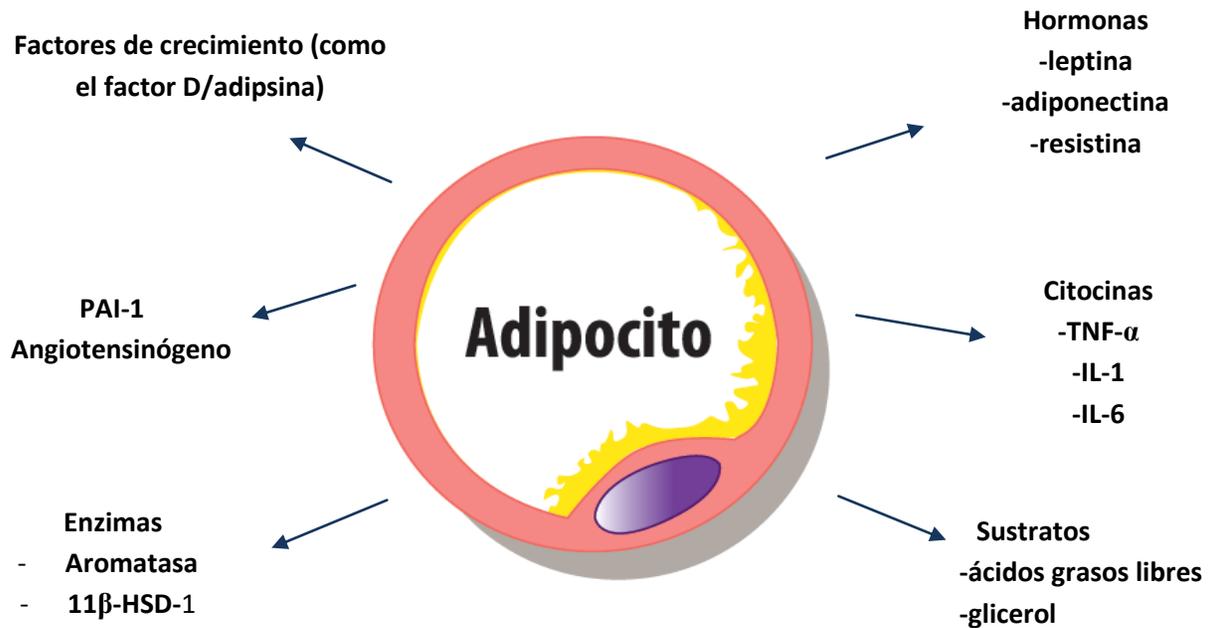


Figura 2: Secreción de adipocinas por el tejido adiposo.⁸

Obesidad

La obesidad se define como una enfermedad crónica, epidémica y prevenible, caracterizada por un incremento crónico en el consumo calórico y una disminución en la actividad física, provocando un desequilibrio a favor del almacenamiento de energía (Figura 3).⁶ Este excedente de energía se acumula en forma de triacilgliceroles (TG) en el tejido adiposo blanco, dando paso a un incremento en tamaño (hipertrofia) y número de adipocitos (hiperplasia).⁶

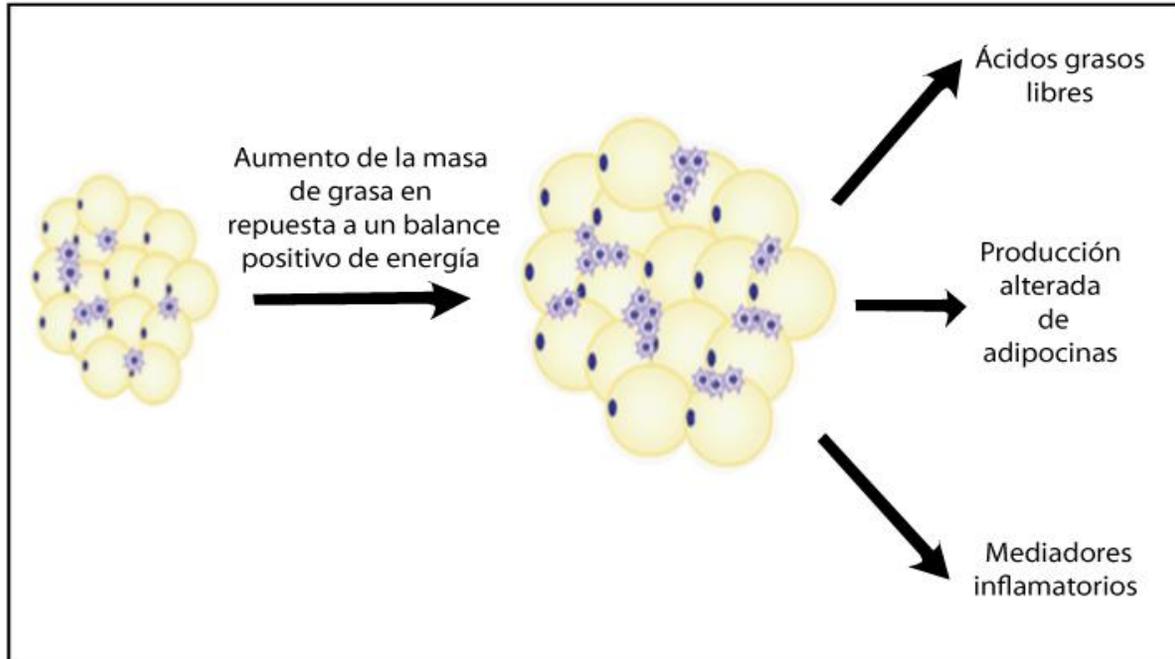


Figura 3. El tejido adiposo blanco y sus complicaciones metabólicas en la obesidad. Además de funcionar como almacén de energía, también tiene función como órgano endocrino, produciendo moléculas circulantes, incluyendo mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-6, IL-1 β) y lípidos bioactivos (FFA), los cuales tienen un impacto importante en mantener la homeostasis metabólica. La inadaptación de los adipocitos en respuesta a un balance positivo de energía conduce a una mayor producción de citocinas proinflamatorias y la liberación de ácidos grasos libres no esterificados. Adaptada de: Jacobi D, Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity, vol.1, num.1, pags: 4-12⁹

En la actualidad, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas alrededor del mundo ya que es el trastorno metabólico más frecuente en los países desarrollados y en vías de desarrollo, su prevalencia se ha duplicado de manera importante en la última década en todos los grupos de edad, incluyendo a niños y adolescentes.¹⁰ En los últimos 20 años se ha expandido en América a una velocidad muy alta. Aproximadamente el 34.1% de los hombres y el 35.8% de las mujeres entre 12 y 19 años presentan problemas de sobrepeso u obesidad, siendo obesos el 14.5% de los hombres y el 12.1% de las mujeres en este grupo de edad.¹¹ Esta condición física es un problema serio de salud ya que representa un

factor de riesgo importante para desarrollar otros padecimientos como diabetes tipo 2, enfermedades cardíacas coronarias, hipertensión y síndrome metabólico, entre otras.²

Previo a la presencia de estos padecimientos, se ha demostrado que el incremento en el tejido adiposo representa el primer paso para desencadenar anomalías iniciales en el metabolismo de glucosa y el desarrollo de resistencia a la insulina asociado a la obesidad.¹² En específico la acumulación de grasa visceral conduce a tener obesidad central (llamada también “obesidad abdominal”).²

Diversos estudios han demostrado que el tejido adiposo de individuos obesos muestra un incremento en la secreción de adipocinas, algunas de ellas con función proinflamatoria como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL1) y la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS).⁹ Además de adiponectina, resistina, adiposina, leptina, y componentes del sistema renina-angiotensina.⁵ (Figura 2). El tejido adiposo también secreta otras proteínas involucradas en el proceso inflamatorio como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la quimiocina del receptor tipo 2 (CCR2) importante en la diferenciación de monocitos a macrófagos. Debido a esto se ha considerado que la obesidad es un estado crónico de inflamación leve.

Capítulo 2

● Inflamación

El tejido adiposo también es un participante activo en la respuesta inmune y en la inflamación debido a la presencia de un componente celular, los macrófagos.

Las primeras evidencias del estado inflamatorio en el tejido adiposo fueron la presencia de macrófagos (algunos de ellos provenientes de la diferenciación de monocitos) en el tejido adiposo de sujetos obesos. Además, la expresión de ciertos genes en macrófagos y otras células del tejido adiposo ha mostrado que los primeros son la fuente principal de síntesis de TNF- α y otras citocinas proinflamatorias. También se ha observado que la cantidad de macrófagos en tejido adiposo blanco correlaciona positivamente con el índice de masa corporal y el tamaño de los adipocitos.⁹

Para explicar la patogénesis de la obesidad asociada a la inflamación, se han propuesto varias vías de señalización. La más estudiada es la que establece una relación entre el tejido adiposo y el sistema inmune. En esta vía, la activación de receptores tipo Toll 4 (TLR4) por sus ligandos ácidos grasos saturados estimula al factor de transcripción NF- $\kappa\beta$, permitiendo un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1) en los adipocitos. En condiciones inflamatorias se ha observado que estas citocinas y la leptina, aumentan la diapédesis de monocitos en sangre, también estimulan la proliferación y la

actividad fagocítica de monocitos/macrófagos, la quimiotaxis de neutrófilos y el aumento en la síntesis de radicales de oxígeno.¹³

Todas estas evidencias indican que existe infiltración de células inflamatorias en el tejido adiposo (principalmente de macrófagos) y la secreción de moléculas proinflamatorias incrementa en el plasma circulante.⁷ Sin embargo, este tipo de inflamación, es una respuesta inmunológica anormal indicativa del mal funcionamiento del tejido adiposo que también depende de la infiltración de macrófagos en este tejido.⁹

El mecanismo de infiltración de macrófagos en el tejido adiposo aún no está totalmente dilucidado. Pero se ha aceptado que la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) que también se conoce como quimiocina del ligando 2 del motivo C-C (CCL2), pertenece a las citocinas proinflamatorias que atraen macrófagos al tejido adiposo. La MCP-1 es sintetizada predominantemente por macrófagos y células endoteliales y es un potente factor quimiotáctico para monocitos (precursor de macrófagos), siendo esta proteína y sus receptores (CCR2) importantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria.¹⁴ Las células endoteliales estimulan la producción de MCP-1 por lo tanto participan en el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo tal y como lo han sugerido varios estudios.¹⁵ Además, se ha observado que el producto proteico del gen CCR2 controla la conducta alimentaria, estimula el desarrollo de obesidad y de inflamación asociada con obesidad en tejido adiposo, es el principal inductor de la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo e influye negativamente en la sensibilidad a la insulina.¹⁵ Estos hallazgos han surgido de estudios en donde se

ha agregado un antagonista de CCR2, los hallazgos muestran que la presencia del antagonista reduce la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo y mejora la sensibilidad a la insulina. De manera que cualquier tratamiento que disminuya la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en obesos, tendrá efectos benéficos en la respuesta inflamatoria ya que los macrófagos producen citocinas proinflamatorias y estas interrumpen la unión de la insulina con su receptor.¹⁵

Por otro lado, los monocitos se diferencian a macrófagos en donde el gen de diferenciación de monocitos a macrófagos (MMD) está altamente expresado en macrófagos maduros y ausente en monocitos. Este gen codifica para una proteína que se considera un miembro de la familia de receptores adipoQ (PAQR), involucrada en la activación de macrófagos. Se sabe que la sobreexpresión de MMD en macrófagos incrementa la producción de TNF- α , esto sugiere que MMD modula la expresión de TNF- α en macrófagos.¹⁶

Citocinas Proinflamatorias

Las citocinas originalmente fueron llamadas linfocinas y monocinas para indicar la fuente celular de la cual provienen, ahora se sabe que el termino citocina es la mejor descripción desde que casi todas las células nucleadas son capaces de sintetizar estas proteínas y, a su vez, de responder a ellas.¹⁷

Durante la obesidad el sistema inmune experimenta cambios que incluyen un incremento gradual en la producción y circulación de citocinas proinflamatorias

como IL-6, TNF- α e IL-1.¹⁸ Esto es de particular interés dado que dichos cambios contribuyen a una mayor gravedad en enfermedades inflamatorias.

TNF- α

El TNF- α es una citocina clave por su papel mediador en la respuesta inflamatoria dada por la invasión de microorganismos. Normalmente esta citocina actúa sobre diferentes tipos celulares como los adipocitos, asimismo, tiene efectos sobre el sistema endócrino y hematopoyético.¹⁹ Aunque también relacionado con estado de caquexia, hoy se reconoce al TNF- α como un mediador importante de resistencia a la insulina en la obesidad. Se expresa principalmente en macrófagos y linfocitos, aunque los adipocitos también lo expresan junto con sus receptores. En la obesidad, la expresión del RNAm de TNF- α está aumentada en tejido adiposo.²⁰ La unión de TNF- α a su receptor activa las cinasas de la familia IKK (cinasa inhibidora de NF- κ B), que produce la fosforilación del inhibidor del factor nuclear κ B (I κ B), activando el factor nuclear κ B (NF- κ B), principal mediador de las acciones de TNF- α .²⁰ En células del tejido adiposo, TNF- α estimula y disminuye la expresión de genes a través de NF- κ B. Los genes estimulados incluyen al propio NF- κ B, citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-1) factores de crecimiento, enzimas y moléculas de señalización.²⁰

Las acciones biológicas del TNF- α incluyen la inducción de resistencia a insulina. Se ha observado que la cantidad de RNAm de TNF- α se correlaciona positivamente con la adiposidad, es por ello que tras una disminución en el peso, disminuye la expresión de esta citocina. La expresión del RNAm de TNF- α está

también correlacionada con la hiperinsulinemia, mostrando asociaciones positivas con las concentraciones de insulina y triglicéridos en ayuno.^{21, 22} La exposición de las células a TNF- α estimula la fosforilación inhibitoria de serina del IRS-1. De manera que se considera a TNF- α como un mediador proinflamatorio que introduce un vínculo entre inflamación, obesidad y resistencia a la insulina.

IL-6

La IL-6 es una citocina secretada por células del sistema inmune (monocitos/macrófagos) fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético, núcleos hipotalámicos y tejido adiposo.²⁰ Además, tiene la característica de expresarse en leucocitos ya que estos contribuyen e interactúan con el metabolismo del tejido adiposo²³, así que sus niveles se encuentran elevados en la obesidad. La expresión de IL-6 por el tejido adiposo está aumentada en los estados de resistencia a la insulina. Además, sus niveles séricos se relacionan bien con la hiperinsulinemia, y son predictores del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y disminuyen con la reducción de peso.²⁰ Asimismo, IL-6 estimula la producción de proteína C reactiva, esto puede explicar parte del estado de inflamación asociado con la obesidad.²⁴

La IL-6 puede actuar a varios niveles, tanto de forma parácrina y autócrina en el tejido adiposo, como de manera endócrina en los tejidos periféricos, alterando el peso corporal, la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina.²⁵ Se ha propuesto que la IL-6 participa en la resistencia a la insulina alterando la señalización en los hepatocitos por la inducción del supresor de la señalización de

citocinas 3 (SOCS-3), inhibiendo la autofosforilación del receptor de la insulina dependiente de insulina, en adipocitos disminuye la activación del IRS-1 y la PI-3 cinasa.²⁵

IL-1 β

Esta citocina proinflamatoria es producida y secretada cuando se incrementa el dolor y cuando se presenta inflamación. En tales condiciones, IL-1 β se secreta en varios tipos celulares como las células mononucleares, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales.²⁶ Las citocinas proinflamatorias producidas en tejido adiposo por monocitos y macrófagos en sitios de inflamación pueden entrar a circulación.²⁷ Se conocen dos tipos de IL-1 denominadas; IL-1 α e IL-1 β , codificados por genes diferentes, de escasa homología en la secuencia de aminoácidos. La diferencia radica en que la IL-1 α es mayormente intracelular y la IL-1 β es secretada a la circulación, pero son los macrófagos las células que expresan IL-1 β .²⁸ La IL-1 favorece la activación de los linfocitos T cooperadores (Th) por parte de las células presentadoras de antígenos (APC). La IL-1, al igual que el TNF- α , aumenta la eficacia con la que una APC puede unir células Th. Además de TNF- α , la IL-1, también actúa de manera parácrina sobre las células Th, dando lugar a la expresión de otras citocinas. Así, la IL-1, actúa de forma sinérgica con otras interleucinas como la IL-6 y el TNF- α , influyendo sobre la respuesta inmune.²⁸

Capítulo 3

• Resistencia a la Insulina

La resistencia a la insulina se caracteriza por un descenso en la habilidad de la insulina para estimular el uso y transporte de glucosa por los músculos y el tejido adiposo, también suprime la producción y salida de glucosa hepática. Además, esta alteración indica una resistencia a la acción de la insulina sobre el metabolismo de lípidos y proteínas, en la función vascular endotelial y la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y de la insulina.²⁴

Se ha propuesto que la resistencia a la insulina se debe a factores genéticos y ambientales. El componente genético parece ser de naturaleza poligénica y se han sugerido a varios genes como posibles candidatos. Sin embargo, existen otros factores que pueden influir en la sensibilidad a la insulina, como la obesidad, género, origen étnico, pubertad, estilo de vida sedentaria y la dieta.²⁴

Vías moleculares proinflamatorias generadoras de resistencia a la insulina en la obesidad

Varios estudios han implicado a la activación crónica de la vía proinflamatoria del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y de la cinasa aminoterminal c-Jun-1 (JNK1), como los mecanismos subyacentes. La mayoría de estos estudios se han enfocado al

estudio de la activación de estas vías en los tejidos blanco de la insulina (tejido adiposo, hígado y músculo) como un mecanismo celular etiológico. Varias cinasas de serina/treonina son activadas por estímulos inflamatorios o de estrés y contribuyen a la inhibición de la señalización de insulina, siendo las más relevantes la JNK, cinasa β (IKK β) y PKC θ . (Figura 4)¹⁵

Actividad del receptor de insulina

En la última década se ha definido que la inflamación de grado leve está asociada con resistencia a la insulina, y por lo tanto se asume que la inflamación contribuye de una manera importante al desarrollo de esta condición que es clave para el desarrollo de otras enfermedades.²² Diversos estudios han propuesto que la resistencia a la insulina se debe a la inhibición de un postreceptor de transducción de señales, tal es el caso del sustrato del receptor de insulina (IRS).¹⁴ Sin embargo, se han identificado varios defectos en la señalización de la insulina implicados en la patogénesis de resistencia a la insulina por ejemplo, una reducción en la síntesis o un incremento en la degradación de los componentes del sistema receptor-IRS, inhibición de la fosforilación de serina del receptor de insulina, la interacción de los componentes del sistema receptor -IRS con proteínas inhibitorias.²⁴

El receptor de insulina pertenece a la clase de receptores de tipo tirosina cinasa. Este receptor es de tipo transmembranal que es activado por insulina. El receptor de insulina es una proteína heterotetramérica constituida por dos subunidades

extracelulares α y dos subunidades transmembranales β , unidos por puentes disulfuro.²⁹ La unión insulina-receptor activa la fosforilación de varios substratos endógenos en tirosina. El primer sustrato es la subunidad transmembranal β del propio receptor de insulina por un mecanismo de autofosforilación en tirosina que proporcionara sitios blanco de proteínas para iniciar distintas vías de señalización, conocidas como cascada de fosforilación de proteínas. La inhibición de la señalización del receptor de insulina es un mecanismo fundamental a través del cual la señal inflamatoria conduce a la resistencia a la insulina. La exposición de las células a TNF- α o niveles elevados de ácidos grasos libres inhibe la fosforilación de serina IRS-1.³⁰ La unión extracelular de la insulina, induce una unión intracitoplasmática de IRS-1 al receptor. Posteriormente, varias tirosinas en el IRS-1 son fosforilados, esto permite que IRS-1 active otras proteínas cinasas.²⁹ Esta fosforilación reduce tanto la fosforilación de la tirosina IRS-1 en respuesta a la insulina y la capacidad de IRS-1 para asociar con el receptor de la insulina y por lo tanto inhibe la señalización corriente abajo y la acción de la insulina.³⁰

Las citocinas impiden la señalización del receptor de insulina a través de la activación de otras cinasas de serina/treonina. Un ejemplo de esto es IKK β que afecta la señalización de la insulina a través de al menos dos vías: la primera es la fosforilación del IRS1 en serina, y en segundo lugar activa el potente factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, que estimula la expresión de múltiples mediadores inflamatorios involucrados en la regulación de citocinas inflamatorias. Específicamente, NF- κ B controla varias citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), quimosinas (IL-8, MCP-1, MIP-1^a), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM y E-

selectina), y enzimas efectoras inducibles (iNOS y COX-2)^{14,31,32} incluyendo a TNF- α e IL-6.¹⁵

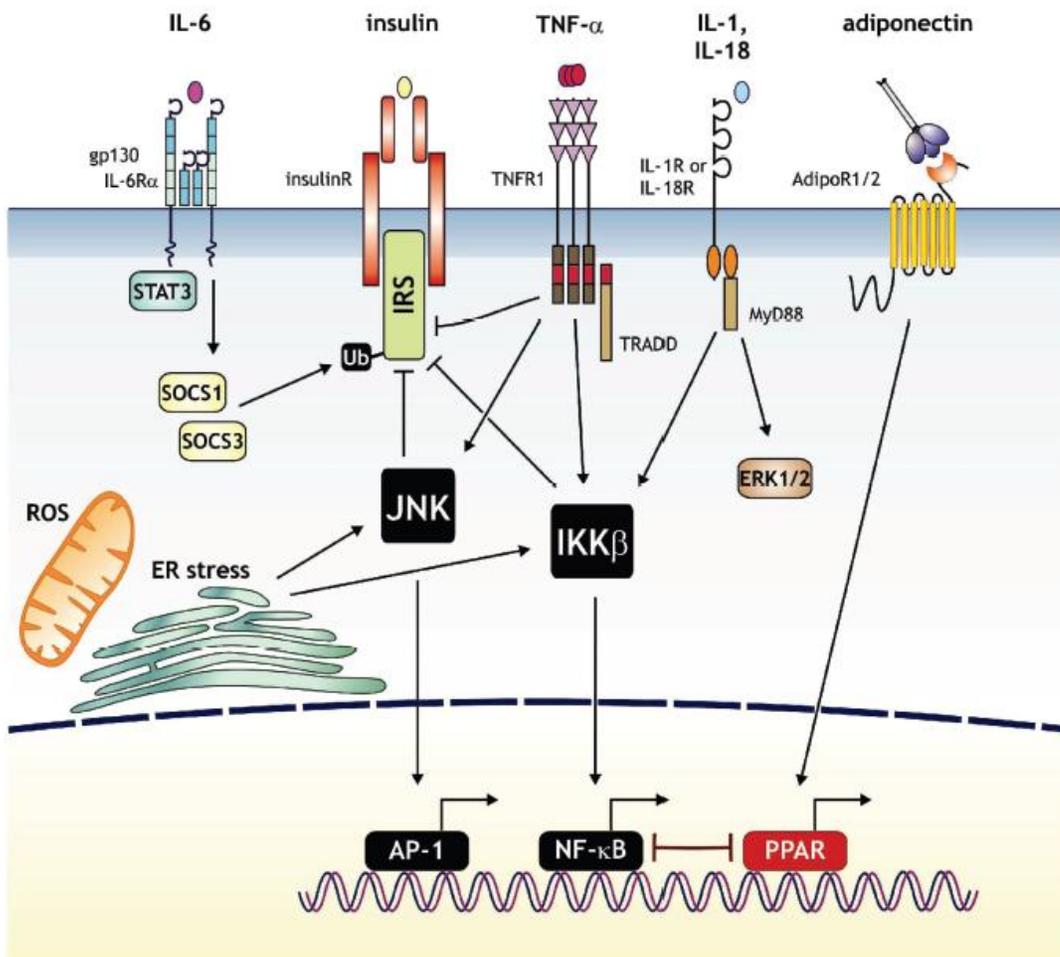


Figura 4: Mecanismos generadores de resistencia a la insulina a través de diferentes vías de señalización y mediadores. La exposición de las células a señales inflamatorias estimula la fosforilación inhibitoria en residuos de serina del IRS-1. Después de que la señal inflamatoria ha impedido la unión del receptor con la insulina se activan varias cinasas de serina/treonina que conducen a resistencia a la insulina.²²

Debido a que la resistencia a la insulina está asociada con un grado leve de inflamación causada por la obesidad, diversas investigaciones se han enfocado a disminuir el estado inflamatorio. El uso de agentes anti-inflamatorios en individuos obesos y con resistencia a la insulina podría ser de gran beneficio. Entre éstos tenemos a los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3.²²

Capítulo 4

- Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, entre 8 y 22. Los ácidos grasos consisten de una cadena hidrocarbonada con un grupo metilo hidrofóbico y un grupo carboxílico hidrofílico. La longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones determinan las propiedades de los diferentes ácidos grasos. Los ácidos grasos presentes en el organismo se encuentran en forma saturada o insaturada debido a la presencia de dobles ligaduras. Los ácidos grasos insaturados pueden ser monoinsaturados o poli-insaturados.³²

Dentro de los ácidos grasos poli-insaturados denominados PUFAs (Long Chain-Poly Unsaturated Fatty Acids por sus siglas en inglés), se encuentran los ácidos grasos linoléico (dos dobles enlaces) y α -linolénico (tres dobles enlaces). Estos ácidos grasos son precursores de dos familias importantes, los ácidos grasos

omega-6 y omega-3 respectivamente. Estas dos familias se diferencian por la posición del primer doble enlace, contando a partir del extremo metilo de la molécula del ácido graso.^{32,33}

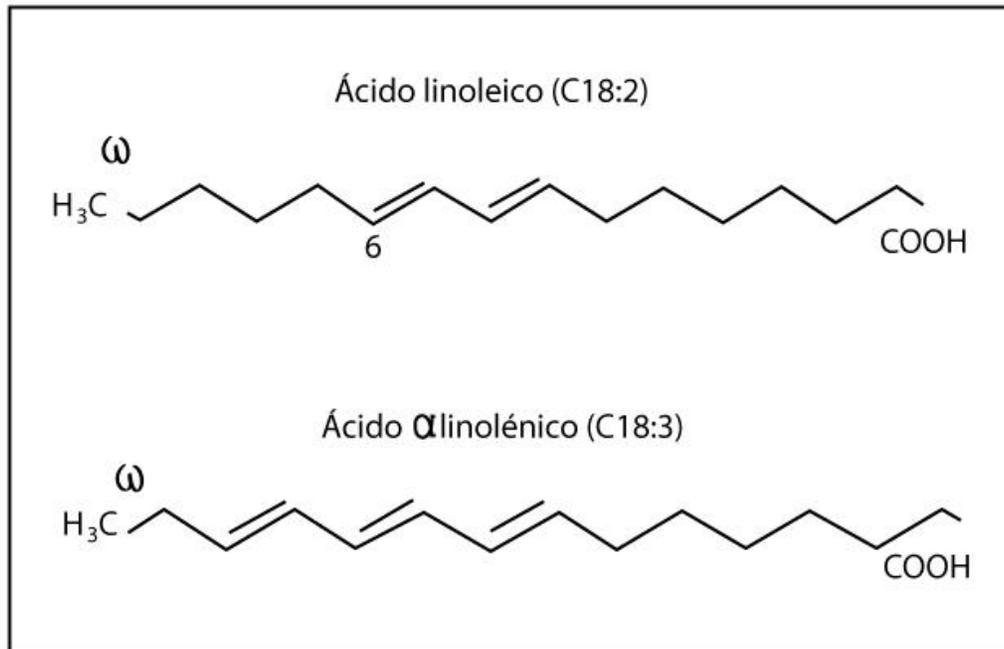


Figura 5: Estructura química de los ácidos grasos esenciales: ácido linoléico y α-linolénico indican que ambos ácidos grasos contienen 18 carbonos con dos y tres dobles enlaces respectivamente.³²

Los ácidos grasos α-linolénico y linoléico son ácidos grasos esenciales que el organismo no sintetiza y por tanto los debe recibir de la dieta, pues en las células del organismo sólo se producen dobles enlaces en los ácidos grasos, después del carbono 9 y no entre el grupo metilo y el carbono-9.^{33,34}

El ácido graso α-linolénico (αALN) de la familia omega-3, es una molécula de 18 átomos de carbono y tiene tres dobles enlaces, la primera se encuentra en el tercer carbono, su nomenclatura es 18:3 ω3.³² Es precursor de los ácidos grasos de cadena muy larga y dentro del organismo, los PUFAs se pueden transformar en

estos ácidos grasos con un mayor número de insaturaciones (LC-PUFAs, long chain-PUFAs), estos son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA).³³

Fuentes alimenticias de los ácidos grasos poli-insaturados omega 3

Los ácidos grasos omega 3 se encuentran principalmente en los aceites vegetales y en el pescado. El pescado es una fuente importante de EPA y DHA, el α ALN se encuentra principalmente en los cloroplastos de los vegetales de hoja verde, en los aceites de soya, canola, nueces, lino, grosella, soja, linaza, en algunos aceites de pescado como la sardina, salmón y bacalao. Los alimentos que contienen más α ALN es el aceite de canola, de soya y la linaza.³²

Mecanismos de acción anti-inflamatoria de los ácidos grasos poli-insaturados omega 3

El papel funcional de los PUFAs a nivel celular incluye formar parte de los lípidos de membrana, ligandos de receptores nucleares o la regulación de factores de transcripción en el núcleo para controlar la expresión de una gran variedad de genes, incluyendo los que regulan el proceso inflamatorio.³² Tomando en cuenta la funcionalidad a nivel celular de los PUFAs omega 3, estos representan una evidencia sobre los efectos benéficos en la inflamación.³⁵

En general, la regulación de las funciones de la célula por los PUFAs puede ocurrir a tres niveles:

- 1) Modulación de la transducción de señales a través del efecto de la bioactividad sobre las membranas celulares. La incorporación del DHA en los fosfolípidos de la membrana plasmática y su retención de dominios en los cuales el colesterol está ausente, es el origen molecular responsable de aumentar la fluidez de las membranas celulares. Se asume que la presencia de dobles enlaces en la cadena acilo incrementa la fluidez, de manera que una membrana rica en DHA es más fluida.^{32,36,37}

- 2) Regulación de la transcripción de genes que controlan la respuesta inflamatoria. EPA y DHA disminuyen la activación de NF- κ B en respuesta a estímulos inflamatorios, por lo tanto inhibe la transcripción de citocinas proinflamatorias. Se ha propuesto que el mecanismo de inhibición de la activación de NF- κ B por el DHA, es a través de inhibir significativamente la fosforilación de I κ Ba (inhibidor de NF- κ B), y como resultado evitar la migración de NF- κ B al núcleo donde se une al DNA y así inhibir la transcripción de secuencias específicas de las citocinas proinflamatorias.^{35,32} (Figura 7). Además los LC-PUFAS disminuyen la expresión de receptores quimiotácticos en leucocitos, disminuye la migración de células inflamatorias, así como también disminuye la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos hacia varios quimioatrayentes de suero. También disminuyen la expresión de moléculas de adhesión en monocitos y macrófagos.^{32,36}

- 3) Regulación a través de mediadores activos implicados en procesos inflamatorios. Disminuye la producción de eicosanoides proinflamatorios y

aumenta la producción de eicosanoides anti-inflamatorios (resolvinas y protectina) derivados del EPA y DHA.^{32,36}

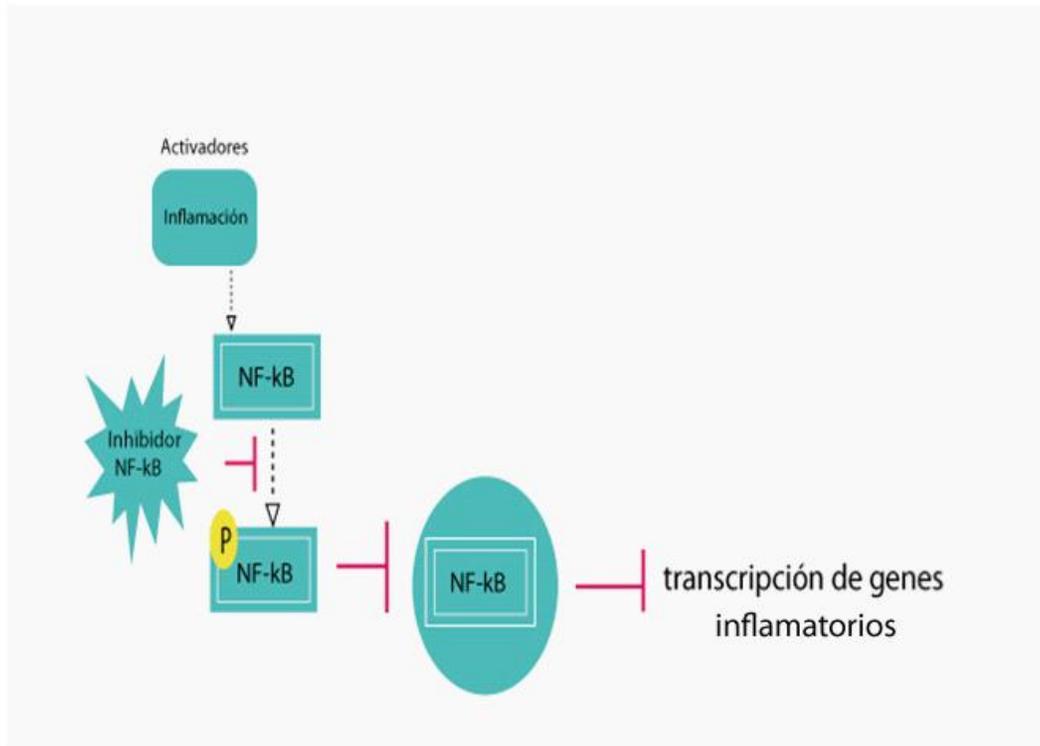


Figura 7: Mecanismo de acción de los omega 3. La señal inflamatoria activa a NF- κ B y la acción de los ácidos grasos omega 3 es inhibir la fosforilación del inhibidor de NF- κ B y como resultado evita la migración de NF- κ B al núcleo donde se une al DNA y así inhibir la transcripción de genes proinflamatorios.³⁸

Tomando en cuenta las propiedades de los ácidos grasos omega 3, es posible utilizarlos como terapia para disminuir la resistencia a la insulina. Esta propuesta surge porque existe suficiente evidencia científica observada en humanos, para emplearlos como agentes que regulan los procesos inflamatorios.

Antecedentes

La obesidad es una condición que se presenta cada vez más frecuente en edades pediátricas, desencadenando alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina en edades tempranas. Existen evidencias que muestran que la obesidad y la resistencia a la insulina coexisten con inflamación, sugiriendo que dicho estado inflamatorio es el vínculo entre estas dos condiciones patológicas. Sin embargo, podemos pensar que si la inflamación tiene una estrecha relación con la obesidad y la resistencia a la insulina, tratar a individuos obesos con agentes anti-inflamatorios, el resultado probablemente sea una reducción de la inflamación, resistencia a la insulina y por ende otras alteraciones metabólicas. Una alternativa para disminuir esta condición es el uso de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3, como el EPA y el DHA, cuyas propiedades anti-inflamatorias son ampliamente reconocidas. Aunque existen varios estudios realizados en humanos, en los cuales se ha suplementado con ácidos grasos omega 3 para disminuir la concentración de marcadores inflamatorios, a nuestro conocimiento solo se han publicado a la fecha dos estudios realizados en adolescentes.

El primero de ellos se realizó en Suiza en el 2010³⁹, en el cual participaron 25 adolescentes obesos sin resistencia a la insulina (14 mujeres y 11 hombres) entre 14 y 17 años en un estudio doble ciego, cruzado con un periodo de lavado de 6 semanas. La suplementación fue por 3 meses recibiendo 1.2 g/día de omega 3 (930 mg EPA + 290 mg DHA) o bien, recibieron como placebo aceite de coco o

palma. Cabe mencionar que durante todo el estudio los pacientes fueron instruidos para mantener su dieta habitual y no realizar ninguna modificación de la actividad física durante todo el tratamiento. Los resultados de este estudio mostraron una disminución de los marcadores de inflamación (TNF- α , IL-1 β , IL-6) en suero mediante inmunoensayos (ELISA) comparado con el grupo placebo. El número de linfocitos y monocitos circulantes disminuyó después del tratamiento. Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de omega 3 en los fosfolípidos séricos incrementa su incorporación en las membranas de células circulantes. Además, se observó un aumento en la concentración de omega 3 en el músculo y en los fosfolípidos del tejido adiposo, lo que hace posible que el omega 3 se incorpore en las membranas de las células e influya en la adhesión de leucocitos y el estado inflamatorio. También se encontró que la suplementación con omega 3 disminuye el reclutamiento de macrófagos, lo que sugiere un menor grado de actividad inflamatoria.

Posteriormente, López Alarcón y col., (2011)⁴⁰ evaluaron el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 sobre las concentraciones séricas de adipocinas y sobre la resistencia a la insulina en 76 adolescentes obesos entre los 9 y 18 con resistencia a la insulina. Los participantes recibieron aleatoriamente 900 mg/día de omega 3 (540 mg EPA+360 mg DHA) o placebo (aceite de maíz) durante 1 mes y se les pidió no hacer modificaciones en su dieta ni en la actividad física. Los resultados mostraron que el grupo que recibió la suplementación con omega 3, aumentó la concentración sérica de adiponectina y disminuyó la de TNF- α y leptina. Pero, no se observaron cambios en la concentración sérica de IL-6

entre grupos ni por tratamiento. Esto puede atribuirse a que el tiempo del estudio fue corto (1 mes) y la incorporación de los ácidos grasos dentro de las células se puede observar a partir de 3 o 4 semanas después de suplementar con alguna fuente de omega 3. Pero aun así es posible determinar que el EPA y el DHA son una herramienta benéfica para los adolescentes obesos con resistencia a la insulina, ya que uno de los efectos positivos que se encontraron fue que aumento la concentración sérica de adiponectina y por lo tanto mejoro la sensibilidad a la insulina.

Otros estudios similares con resultados contradictorios acerca del efecto de los ácidos grasos omega 3 se han realizado en adultos⁴¹. Uno de ellos se realizó en sujetos entre 20 y 65 años sin diabetes u otro padecimiento, excepto obesidad. Los pacientes se suplementaron durante 8 semanas con 4 cápsulas (3.36 g/día de omega 3, 460 mg EPA+ 380 mg DHA) o placebo (ácido butírico, presente en la mantequilla) y no hubo restricción en el consumo de alimento durante el estudio en ninguno de los dos grupos. El objetivo principal era observar la expresión de genes inflamatorios en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo, como objetivo secundario determinar las concentraciones plasmáticas de marcadores inflamatorios (IL-6 y proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP)). Los resultados de IL-6 indican que su concentración plasmática disminuye después del tratamiento con ácidos grasos omega 3. Además, se observó que disminuyó la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio expresados por los monocitos y macrófagos (CCL2, CCL-3, HIF1A, TGFB e IL-6). Dado que los pacientes con obesidad presentan un estado inflamatorio, la disminución en la

expresión de CCL2 y CCL3 por efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 indica que tienen menor riesgo de presentar desórdenes metabólicos y cardiovasculares que los sujetos que consumieron el placebo. Existen otro tipo de marcadores que también disminuyeron y que están implicados en procesos de diferenciación de monocitos a macrófagos (CD68 y CD163). Pero los marcadores responsables de indicar la presencia de macrófagos no cambiaron su expresión, esto puede atribuirse a que los omega 3 no disminuyen la expresión de dichos marcadores y por lo tanto disminuye la secreción de citocinas proinflamatorias. Los macrófagos siguen elevados debido a que éstos habitan el tejido de manera habitual pero no necesariamente indican una inflamación activa.

Además, existe otro estudio realizado en adultos⁴² entre 18 y 60 años con IMC entre 30 y 40 kg/m² sin diabetes mellitus o alguna condición en la que presenten inflamación crónica. Los sujetos se dividieron en dos grupos, el primero fue suplementado con aceite de pescado y el segundo fue el grupo placebo. Ambos grupos consumieron 2.04 g de ácidos grasos omega 3 (DHA + EPA) o placebo durante 3 meses. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las citocinas proinflamatorias circulantes (IL-6 y TNF- α) entre los dos grupos de estudio. Tampoco se observaron diferencias antes y después de recibir el tratamiento con los ácidos graso omega 3.

Diversos estudios demuestran que después de suplementar con ácidos grasos omega 3 la concentración sérica de estos ácidos grasos incrementa, por tal motivo los marcadores inflamatorios disminuyen. También se ha observado la disminución en la expresión de citocinas en tejido adiposo de sujetos adultos. Sin

embargo, es necesario obtener una biopsia de este tejido lo cual disminuye la factibilidad del estudio, principalmente si los sujetos de estudio son adolescentes. El estudio de la expresión de las moléculas inflamatorias en células del sistema inmune circulantes, podrían darnos información del estado de inflamación del individuo, principalmente para determinar el efecto que podrían tener los ácidos grasos omega 3 sobre dichas moléculas.

Hasta el momento sólo se ha determinado la concentración de citocinas proinflamatorias en suero y la expresión de algunas citocinas (IL-6) en el tejido adiposo. Se sabe que al consumir ácidos grasos omega 3 la concentración de éstos incrementa en suero, pero no está totalmente claro si disminuye la expresión de genes inflamatorios (IL-6, IL-1, TNF- α , etc.) en células circulantes. La disminución de dicha expresión, influirá positivamente en la sensibilidad a la insulina, lo que implicaría una terapia oportuna para tratar a los pacientes con obesidad.

Planteamiento del Problema

La obesidad es un problema de salud que ha incrementado de manera importante en los últimos años. Es por ello que al conocer el origen inflamatorio de esta condición se busca evaluar si el tratamiento con ácidos grasos omega 3 disminuye la expresión de genes inflamatorios y de esta manera contrarrestar el riesgo de presentar enfermedades relacionadas con la obesidad como es el caso de la resistencia a la insulina en adolescentes.

Justificación

La obesidad se caracteriza por un estado de inflamación crónica, debido a esto el uso de anti-inflamatorio como los LC-PUFAs n-3 podría ser un tratamiento eficaz. El estado inflamatorio está dado por la producción de citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- α) secretadas por el adipocito. Además, existen otras moléculas indicadoras del estado inflamatorio como CCR2 y MMD expresadas en células mononucleares circulantes y que se infiltran en el tejido adiposo y también secretan dichas citocinas. Por lo que, la expresión de citocinas y moléculas inflamatorias (CCR2 y MMD) en células sanguíneas podría reflejar en parte la inflamación producida en el tejido adiposo.⁴³

Hasta el momento se ha determinado el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 sobre la concentración de citocinas proinflamatorias en suero y la expresión de algunas citocinas (IL-6) en el tejido adiposo. Sin embargo, realizar un análisis de expresión a partir de tejido adiposo es un método invasivo y por tratarse de adolescentes es poco factible obtener una muestra de este tejido.

Objetivo

Determinar el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 sobre la expresión génica de moléculas involucradas en procesos inflamatorios en adolescentes obesos con resistencia a la insulina.

Objetivo particular

- Determinar si la suplementación con ácidos grasos omega 3 disminuye la expresión de IL-1, IL-6, TNF- α , MMD y CCR2 en leucocitos de adolescentes obesos con resistencia a la insulina.

Hipótesis

La suplementación con ácidos grasos omega 3 disminuye la expresión génica de las moléculas IL-1, IL-6, TNF- α , MMD y CCR2 involucradas en procesos inflamatorios en adolescentes obesos con resistencia a la insulina.

Material y métodos

Población de estudio

La presente tesis forma parte del proyecto titulado “Impacto de la utilización de LC-PUFAs en la pérdida de peso y resistencia a la insulina en adolescentes obesos” en el que se incluyen adolescentes con resistencia a la insulina mediante el índice de HOMA ($HOMA = [glucosa] \times [insulina]/405$) tomando como punto de corte 3.16 del valor de HOMA⁴⁴ y con obesidad (mayor o igual al percentil de IMC 95) (CDC)⁴⁵. De este estudio, por factibilidad, se incluyeron 30 adolescentes provenientes de la Unidad Médico Familiar número 4, 10 y 26 del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México, D.F.

Tipo de estudio

- 1.- Ensayo clínico controlado, es un estudio experimental en el que los pacientes fueron suplementados con ácidos grasos omega 3 o placebo y se manipuló una de las variables.
- 2.- Longitudinal, porque se estudió el cambio a través del tiempo de determinadas variables y permite hacer inferencias respecto a los cambios realizados.
- 3.- Aleatorizado, debido a que el tratamiento fue distribuido al azar, ya sea suplementado con el tratamiento o con el placebo.
- 4.- Doble Ciego, ni los individuos del estudio ni los investigadores conocen quién pertenece al grupo placebo y quién al grupo de tratamiento.

Ubicación del estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SIGLO XXI, IMSS.

Criterios de inclusión

1. Edad entre 11 y 18 años
2. Obesidad (mayor o igual al percentil de IMC 95)
3. Sin ningún otro padecimiento excepto obesidad.
4. Acepten firmar la carta de consentimiento.

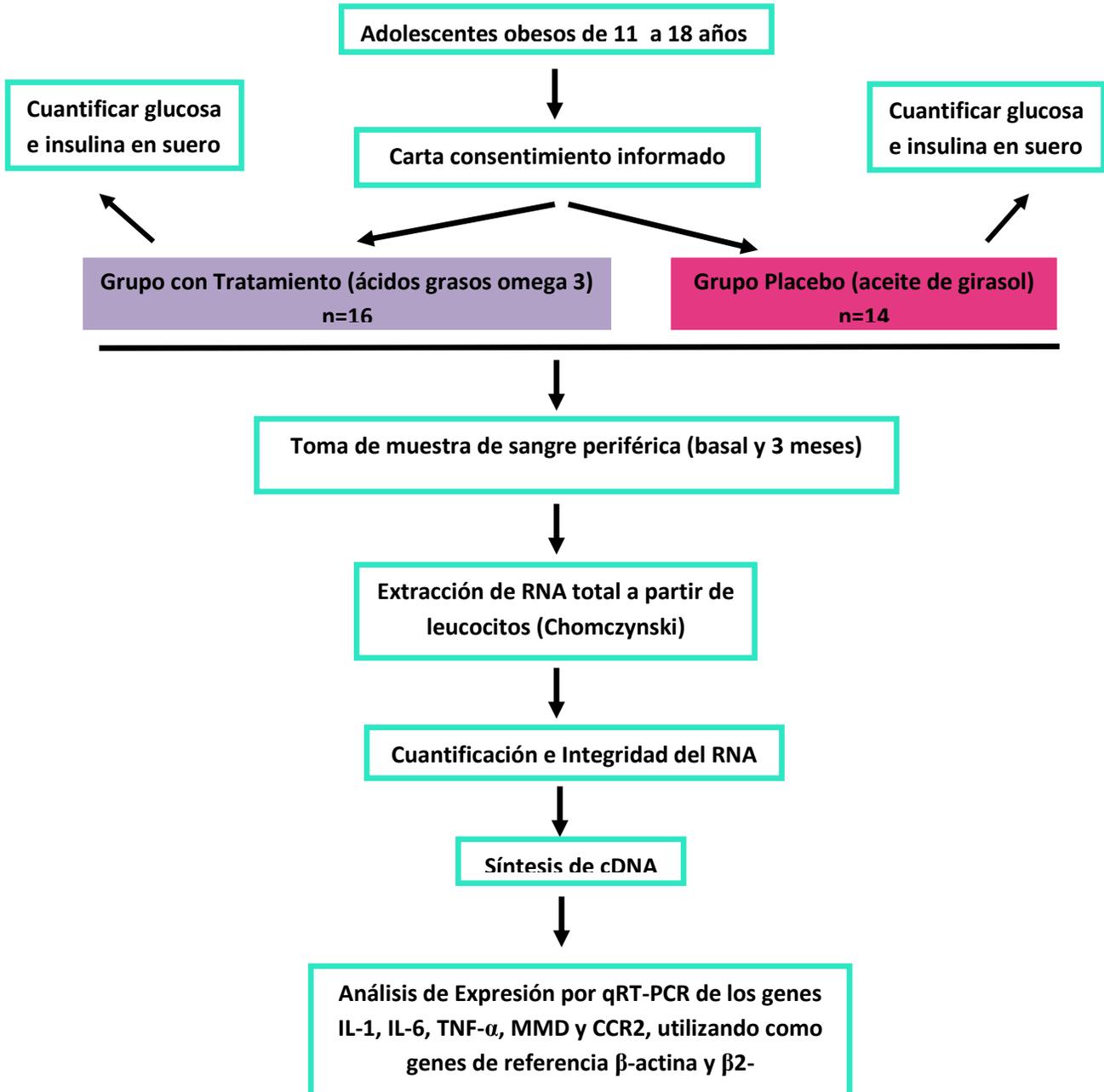
Criterios de eliminación

1. Alergia al pescado.
2. Presenten diabetes mellitus tipo 1 o 2.
3. Tratamiento de tipo anti-inflamatorio.
4. Presentar alguna enfermedad con inflamación crónica.
5. Soliciten salir del protocolo.

Consideraciones éticas

El presente estudio fue evaluado y aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social, cumpliendo con las normas propuestas por la ley general de salud y con las normas éticas institucionales.

Diagrama de flujo



Procedimientos

En el presente estudio se incluyeron 30 adolescentes obesos entre 11 y 18 años de edad provenientes de la Unidad Médico Familiar número 4, 10 y 26 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Después de haber sido invitados a participar en el estudio se les solicitó a los padres que firmaran la carta de consentimiento informado. A los pacientes se les tomó una muestra de sangre periférica con anticoagulante la cual se consideró como basal para la determinación de los genes que se estudiaron. La misma muestra de sangre se utiliza para cuantificar glucosa e insulina en suero. Ambas determinaciones se realizan en el laboratorio clínico, la glucosa se determina mediante métodos enzimáticos (glucosa oxidasa), la insulina por medio de radioinmunoensayo (RIA).

Los pacientes fueron distribuidos de manera aleatoria utilizando un software para aleatorización tomado del documento Mahmood Aaghaui Rabdom Allocation (Software for parallel group randomized trials, BMC Medical Research Methodology 2004) en dos grupos, el primer grupo fue suplementado con 1.2 g/día de omega 3 (aceite de pescado), el segundo fue el grupo placebo o control y recibieron 1 g/día (aceite de girasol). Tomando 2 cápsulas diarias para cubrir la dosis de omega 3 requerida.

Desde el momento en que los pacientes fueron distribuidos en los dos diferentes grupos, tuvieron que consumir la cantidad indicada del suplemento o placebo por 3 meses.

Como parte del tratamiento, los pacientes de ambos grupos recibieron una dieta para llevar un control de sus hábitos alimenticios y se les pidió no incluir algún suplemento que pueda ser otra fuente de ácidos poli-insaturados, así como también mantener la misma rutina de actividad física a la que están acostumbrados.

El apego al tratamiento ya sea del suplemento o del placebo se realizó mediante el conteo de cápsulas.

A partir de la sangre periférica obtenida en la primera visita (muestra basal) y después de haber recibido la suplementación por 3 meses se realizó extracción de RNA total a partir de leucocitos. El RNA total se utilizó para realizar los estudios de expresión de los diferentes transcritos.

Composición del Suplemento

El suplemento proporcionado a los pacientes tiene el nombre de PULSE 600 de la marca MERCK, el cual se distribuye de manera comercial. La dosis diaria que recibieron los participantes es de 800 mg EPA y 400 mg DHA, por lo que deben tomar 2 cápsulas diarias de este suplemento. La información nutricional que contiene el producto se encuentra en la siguiente tabla:

Tabla 1: Información nutrimental del suplemento PULSE 600 (Merck).

Ingrediente	Por cápsula (mg)
Grasas (lípidos) del cual:	1000
Grasa saturada	150,00
Grasa poli-insaturada del cual:	800,00
Ácido eicosapentaenoico	400,00
Ácido docosahexaenoico	200,00
Grasa mono-insaturada	50,00
Ácidos grasos trans	0,00
Colesterol	0,24
Proteínas	250
Hidratos de carbono de los cuales:	0,00
Fibra dietética	0,00
Sodio	0,00

Expresión de RNAm de citocinas proinflamatorias y de marcadores de inflamación CCR2 y MMD

Extracción del RNA total

A partir de leucocitos presentes en sangre periférica se extrajo RNA total usando el método Chomczynski.⁴⁶ (ANEXO I)

El fundamento del método consiste en la utilización de tiocianato de guanidina, el cual es uno de los desnaturalizantes de proteínas más efectivos y facilita el aislamiento intacto y funcional del RNA. Para precipitar el botón de RNA se utiliza isopropanol a -20°C. Para purificarlo se utiliza DNAsa para eliminar el exceso de DNA que pueda contener la muestra y únicamente obtener el RNA total. El botón de RNA se disuelve en agua grado biología molecular en un volumen de 30 µL. El RNA total purificado se cuantificó y se determinó su pureza e integridad.⁴⁶

Pureza y Cuantificación del RNA total

Se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000) a diferentes longitudes de onda (230 nm, 260 nm y 280 nm), tomando 2 μL de agua inyectable para ajustar a cero la lectura y posteriormente se tomó 1 μL de muestra. La lectura a 260 nm es el valor máximo de absorción de los ácidos nucleicos debido a las bases nitrogenadas que los forman. Las proteínas, fenol y algunos contaminantes tienen un máximo de absorbancia a alrededor de 280 nm, por lo que la relación 260/280 nos permite conocer la pureza del RNA. El valor de esta relación debe ser lo más cercano a 2.0 entre 1.7 y 2.0. Si el valor es menor a 1.7 significa que existe contaminación significativa con fenol o proteínas. A 230 nm es el pico de absorción de algunos disolventes orgánicos y algunos carbohidratos. La relación 260/230 asegura que no hay contaminación y el valor debe ser mayor a 1.8. (Nanodrop Spectrophotometer V3.7)

Para calcular la concentración de RNA total se realiza la lectura a 260 nm que permite calcular la concentración del ácido nucleico de la siguiente manera:

En donde: $1\text{DO}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$ de RNA

$$[\text{RNA}]_{\mu\text{g/ml}} = (40\mu\text{g/ml})(\text{Absorbancia a } 260\text{nm})$$

Integridad del RNA

Para evaluar la integridad del RNA total, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Invitrogen, Ultra Pure™ Agarose car. No. 15510-019) teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a 90 volts por 90 minutos en una cámara horizontal con una fuente de poder BIO RAD (PowerPac Basic). Los diferentes RNAr 18s, 28s se visualizaron mediante un analizador de imágenes Alpha Innotech. Se considera que el RNA está íntegro si se observan estos tipos de RNAs mediante bandas bien definidas. Una vez comprobada la calidad del RNA total se procedió a la síntesis de cDNA.

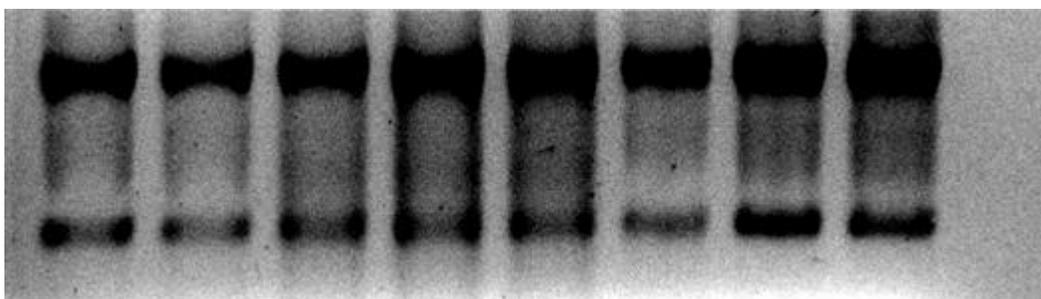


Figura 6: Se muestra la integridad del RNA. La subunidad mayor corresponde a la 28 S y la menor a la 18 S.

Síntesis de cDNA

La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó usando el estuche TaqMan® de la marca Applied Biosystems (No. 808-0234) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Roche) ver ANEXO II.

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total por medio de la transcripción reversa (TaqPolimerasa), utilizando oligo dT. Las moléculas de RNAm funcionan como

molde y el oligo dT como cebador. Además, se requiere la presencia de dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resulta una hebra de DNA complementario. El cDNA sintetizado se utilizó posteriormente como molde para su amplificación mediante PCR.

PCR punto final

Con la finalidad de corroborar la adecuada síntesis del cDNA se realizó un PCR de punto final para una región de los genes control, beta actina y beta 2 microglobulina. (ANEXO III).

Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Se determinó el tamaño de estos productos, utilizando un marcador de pares de bases visualizándolos en un analizador de imágenes Alpha Innotech.

Una vez confirmada la correcta síntesis de los cDNA se procedió a cuantificar el transcrito de los diferentes genes mediante PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

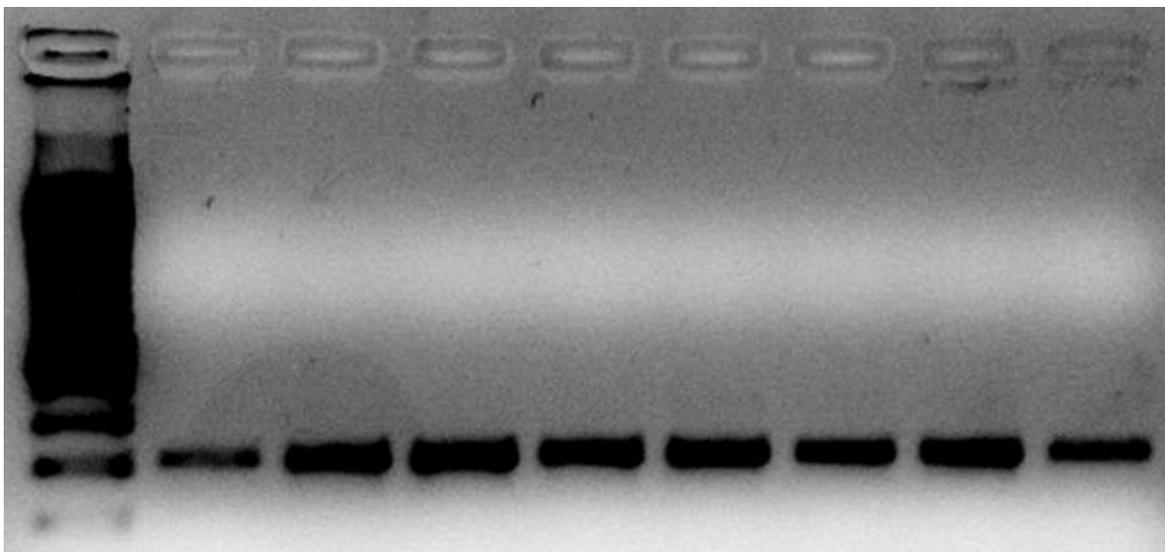


Figura 7: PCR punto final

Cuantificación del RNAm por qRT-PCR

Se cuantificó el RNAm de la IL-1, IL-6, TNF- α , MMD y CCR2 utilizando qRT-PCR. Los genes de referencia utilizados fueron β -actina y β - 2 microglobulina. Estos genes son de expresión constitutiva puesto que son transcripcional y traduccionalmente activos en leucocitos circulantes.^{47,48} (La secuencia de primers utilizados para la cuantificación de RNAm se describe en la tabla 2)

El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método de $\Delta\Delta C_p$ en el que la proporción de la expresión relativa de un gen blanco (R) es calculada en base a la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real y a la diferencia del C_p de una muestra desconocida contra un control y expresada en comparación a un gen de referencia.^{49,50}

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$$\text{PROPORCIÓN} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_{p_{\text{blanco}}}}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{p_{\text{referencia}}}}}$$

Donde:

E= la eficiencia amplificación

ΔC_p para cada gen (referencia o blanco) se obtiene de:

$$\Delta C_{p_{\text{blanco}}} = C_{p_{\text{blanco}}} - C_{p_{\text{tratadas}}}$$

$$\Delta C_{p_{\text{referencia}}} = C_{p_{\text{control}}} - C_{p_{\text{tratadas}}}$$

La qRT-PCR es un método semi-cuantitativo para la detección y medida de productos generados durante cada ciclo de PCR. (ANEXO IV).

La generación de los productos de PCR se cuantifica en base a la medición de la señal fluorescente del SYBER Green, este compuesto cromógeno se intercala en la doble hélice del DNA. Cuando el cromógeno no se encuentra unido al material genético, emite muy poca fluorescencia. Sin embargo, la fluorescencia (a una longitud de onda de 530-548 nm) aumenta importantemente cuando se une al DNA. Así que, durante el PCR el incremento de la fluorescencia del SYBR Green es directamente proporcional a la cantidad generada de DNA de doble cadena.

Tabla 2: Secuencia de primers utilizados para la cuantificación de RNAm

Gen	Forward	Reverse	Tm
Genes de referencia			
β- actina	CTggAACggTgAAggTgACA	AAgggACTTCCTgTAACAATgCA	62°C
β-dos microglobulina	TgCTgTCTCCATgTTTgATgTATCT	TCTCTgCTCCCCACCTCTAAgT	62°C
Genes de estudio			
TNF-α	TCCTTCAgACACCCTCAACC	CAGggATCAAAGCTgTAggC	60°C
MMD	CAGgggAAgTCTCAAAGCAg	AggCCCAAgCCACTCTATTT	60°C
CCR2	CAGgggAAgTCTCAAAGCAg	AggCCCAAgCCACTCTATTT	60°C
IL-1β	CCATgTCCACCCAAGTCTCT	ATCgCTCCAAGCACTCTTGTT	60°C
IL-6	ggACAACCTCAGggATgCAAT	gCAgAAgAgAgCCAACCAAC	60°C

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), C-C quimiocinas de receptor tipo 2 (CCR2), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6)

NOTA: El diseño de los primers se realizó con el programa Primer3 Plus (v. 0.4.0)

Análisis Estadístico

Los valores de expresión se presentan como promedio \pm error estándar. Se analizó la diferencia en la expresión entre el tiempo basal y 3 meses de suplementación de los grupos placebo y con tratamiento. También se compararon los tiempos basales y 3 meses de suplementación de ambos grupos. Los valores que tuvieron distribución no normal se analizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los valores de expresión se compararon entre los tiempos intergrupo con una *t-Student* e intragrupo con *t-Pareada*. Los valores se consideraron significativamente diferentes con una $P < 0.05$.

Resultados

En este estudio se analizó el efecto de la suplementación diaria (1.2 g) con ácidos grasos omega 3 sobre la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) y marcadores de diferenciación de macrófagos y monocitos (MMD y CCR2) en RNA total de leucocitos de adolescentes obesos durante 3 meses.

La tabla 3 muestra los datos demográficos, antropométricos y bioquímicos de los dos grupos de estudio, antes y 3 meses después de la suplementación. Con respecto a la edad, el peso y la talla, los dos grupos no muestran diferencias significativas entre ellos ni al momento de iniciar el estudio ni después de 3 meses. Dado que en el peso no hubo cambios significativos, el IMC tampoco se modificó y en todos los casos el IMC corresponde al de sujetos obesos, por lo tanto el percentil IMC se encuentra por arriba de 95 en los dos grupos durante los 3 meses de suplementación. La glucosa de todos los sujetos se encuentra dentro del intervalo normal (70 – 100 mg/dL) a lo largo del estudio. Sin embargo, la concentración de insulina indica hiperinsulinemia en cualquier momento del tratamiento en ambos grupos. Aunque, en el grupo placebo disminuyó la concentración de insulina significativamente ($P= 0.01$) a los 3 meses. Respecto al valor de HOMA, los resultados muestran que está por arriba del punto de corte para adolescentes antes y después de la suplementación. Por lo tanto los sujetos de estudio son resistentes a la insulina desde el inicio de la suplementación y hasta los 3 meses de ésta.

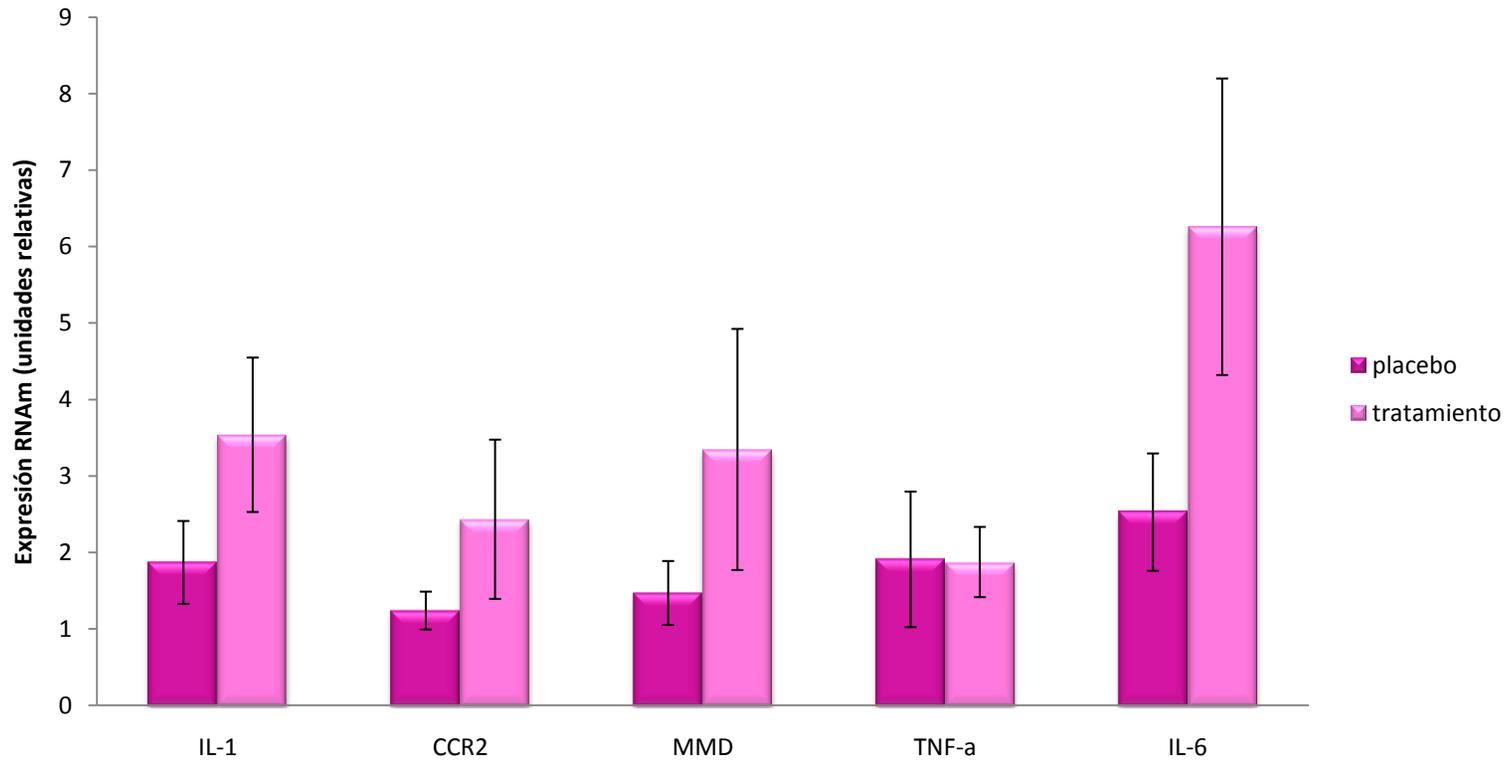
Tabla 3: Datos demográficos, antropométricos y bioquímicos de adolescentes suplementados con ácidos grasos omega 3 o placebo.

	Placebo		Tratamiento	
	Basal (n = 14)	3 meses post-suplementación (n = 14)	Basal (n = 16)	3 meses post-suplementación (n = 16)
edad	12.8 ± .97		13.1 ± 1.54	
género	H = 9, M = 5		H = 6, M = 10	
peso (kg)	82.9 ± 11.60	82.7 ± 12.56	76.9 ± 12.13	77 ± 11.98
talla (m)	1.63 ± .067	1.64 ± .066	1.59 ± .073	1.60 ± .072
IMC (kg/m²)	31.0 ± 3.35	30.4 ± 3.83	30.2 ± 2.95	29.8 ± 3.05
percentil IMC	99.5	98.9	98.9	98.6
glucosa (mg/dL)	91.4 ± 7.46	89 ± 7.76	90.7 ± 9.80	91 ± 7.65
Insulina (µg/dL)	38.5 ± 12.52	33.2 ± 8.70*	34.2 ± 12.97	34.7 ± 14.49
HOMA	6.2 ± 4.87	5.4 ± 3.90	6.9 ± 4.12	6.9 ± 4.14

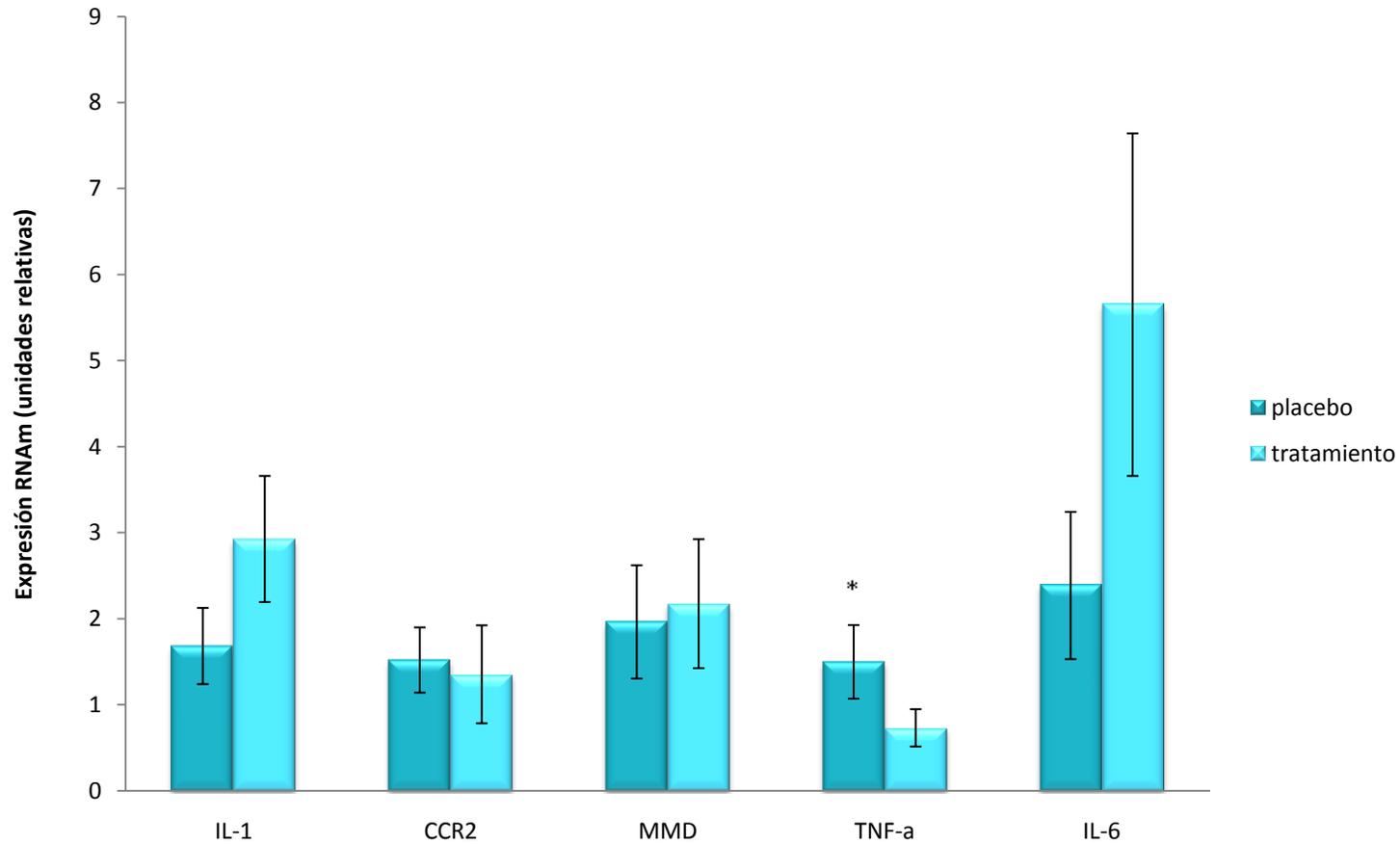
Todos los parámetros tuvieron distribución normal por lo que se compararon con una *t-Student* excepto por los niveles de insulina que presentaron distribución no normal y se analizaron con la prueba U de Mann Whitney. *P < .05

Expresión del RNAm de las moléculas inflamatorias en leucocitos de adolescentes obesos.

La expresión relativa de los genes estudiados involucrados en la inflamación durante la obesidad se normalizó con los genes endógenos β -actina y β 2-microglobulina. El primer análisis que se realizó fue tomando en cuenta la expresión en los niveles basales de los dos grupos de estudio y así conocer la expresión de las moléculas implicadas en la obesidad antes de iniciar algún tratamiento. En la gráfica 1 se muestra los niveles de expresión normalizados con β -actina de los cinco genes en estudio. Los resultados indican que la expresión en ambos grupos no presenta diferencia entre ellos. Cuando los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β 2-microglobulina, los niveles de expresión de los genes muestran niveles de expresión similar entre el grupo con tratamiento comparado con el grupo placebo a excepción de TNF- α que está mayormente expresada en el grupo placebo ($P < 0.05$) al inicio del estudio (gráfica 2).

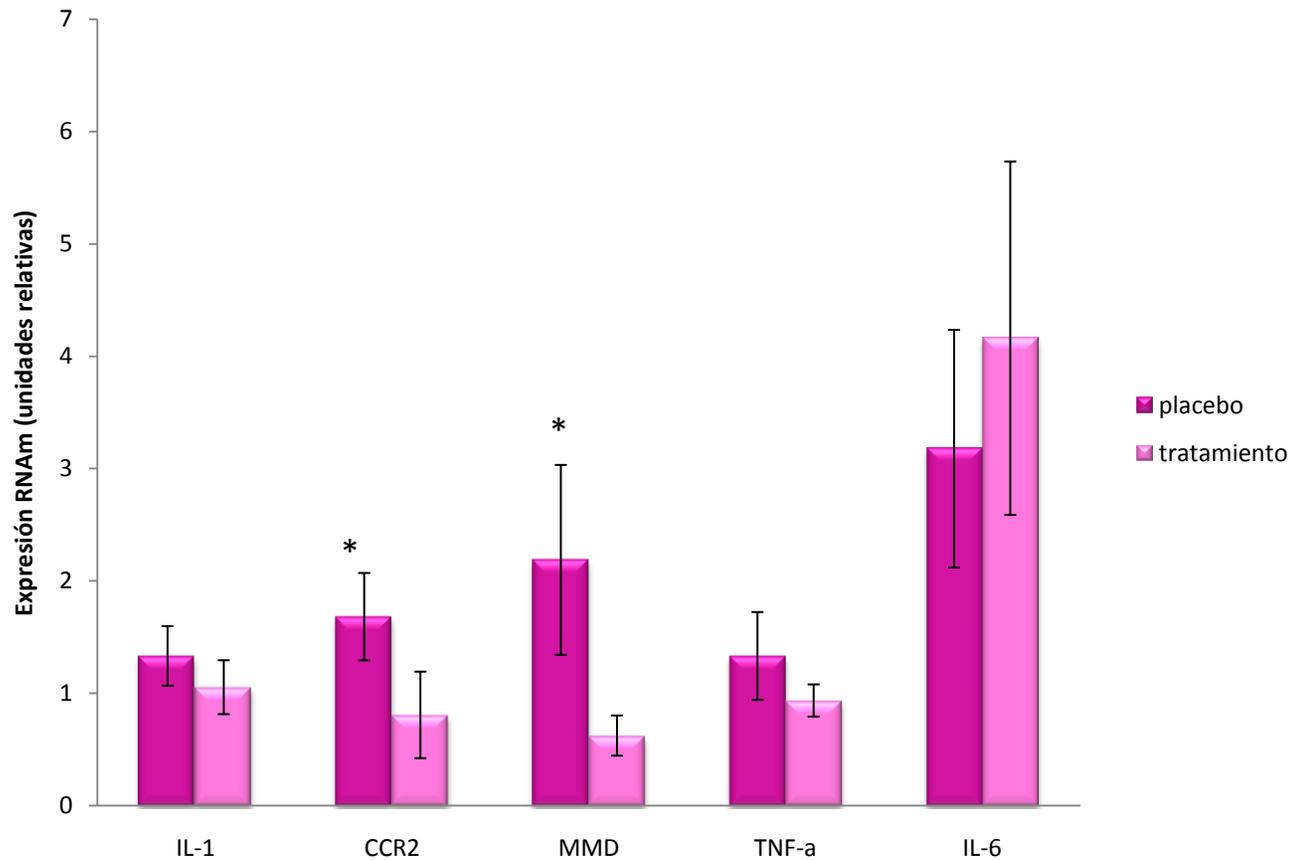


Gráfica 1: Expresión basal (Tiempo 0) de moléculas que participan en procesos inflamatorios del grupo placebo (n = 14) y con tratamiento (n = 16). Los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β -actina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-student*. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

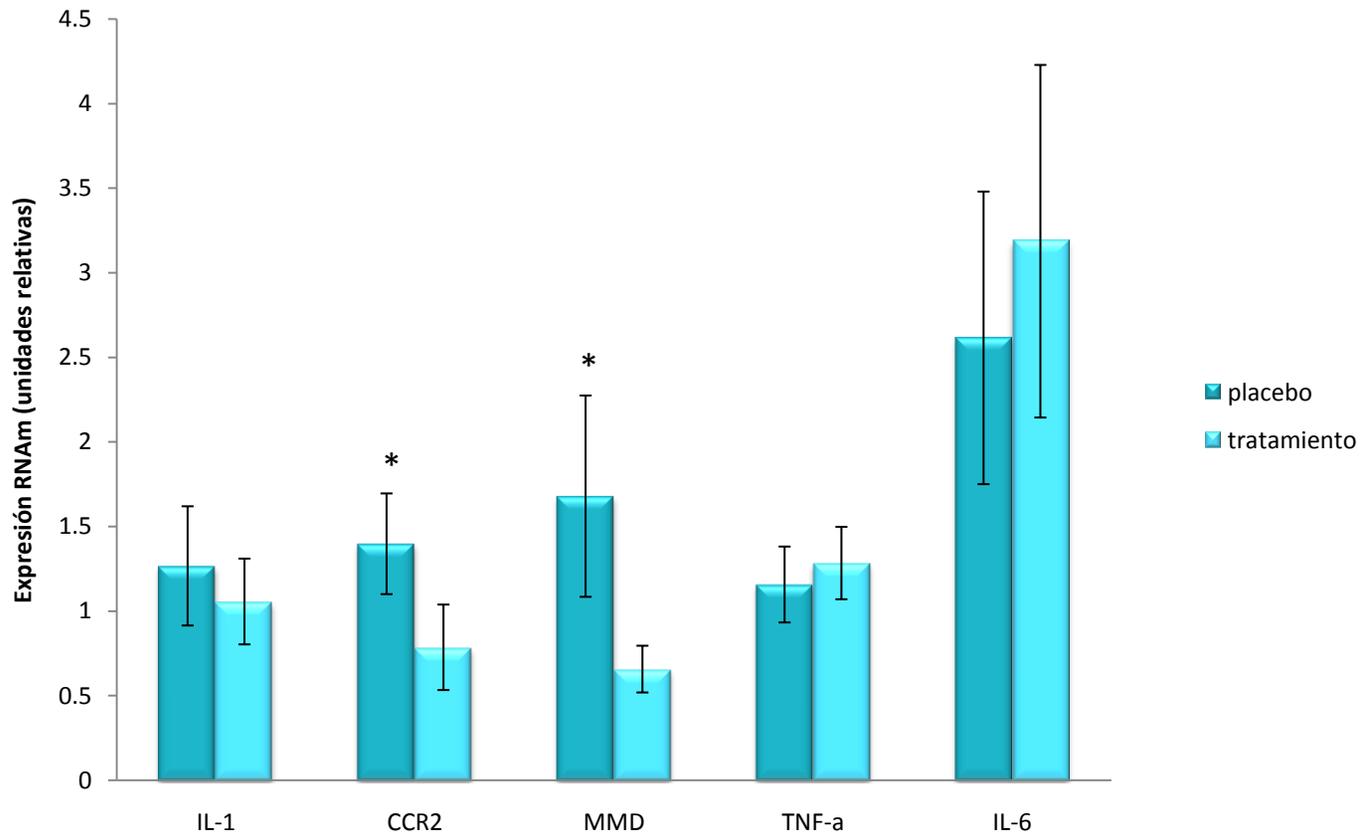


Gráfica 2: Expresión basal (Tiempo 0) de moléculas que participan en procesos inflamatorios del grupo placebo (n = 14) y con tratamiento (n = 16). Los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β 2-microglobulina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Student*. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). * $P < 0.05$ Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Después de comparar la expresión basal de ambos grupos, el siguiente análisis fue comparar la expresión a los de 3 meses de suplementación para determinar el efecto de los omega 3 con el placebo. Los resultados indican que cuando los datos de expresión se normalizaron con β -actina (gráfica 3) o β 2- microglobulina (gráfica 4), la comparación entre ambos grupos no presentó diferencias significativas en la expresión de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, la expresión de los marcadores de diferenciación de macrófagos y monocitos MMD y CCR2 disminuyó significativamente ($P < 0.05$) a los 3 meses de tratamiento con ácidos grasos omega 3.

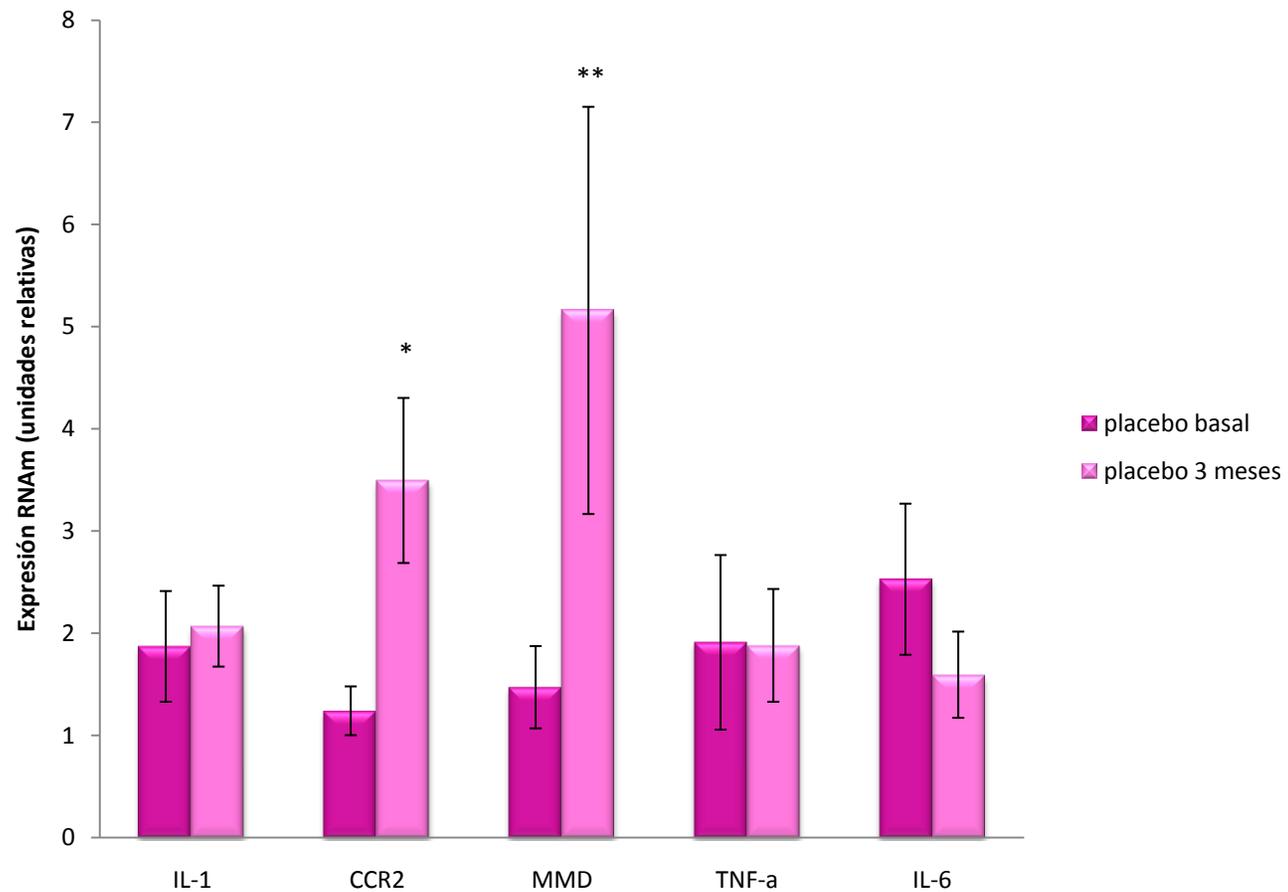


Gráfica 3: Expresión de moléculas que participan en procesos inflamatorios a los 3 meses de suplementación del grupo placebo (n = 14) y con tratamiento (n = 16) con ácidos grasos omega 3. Los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β -actina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Student*. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). *P < 0.05 Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

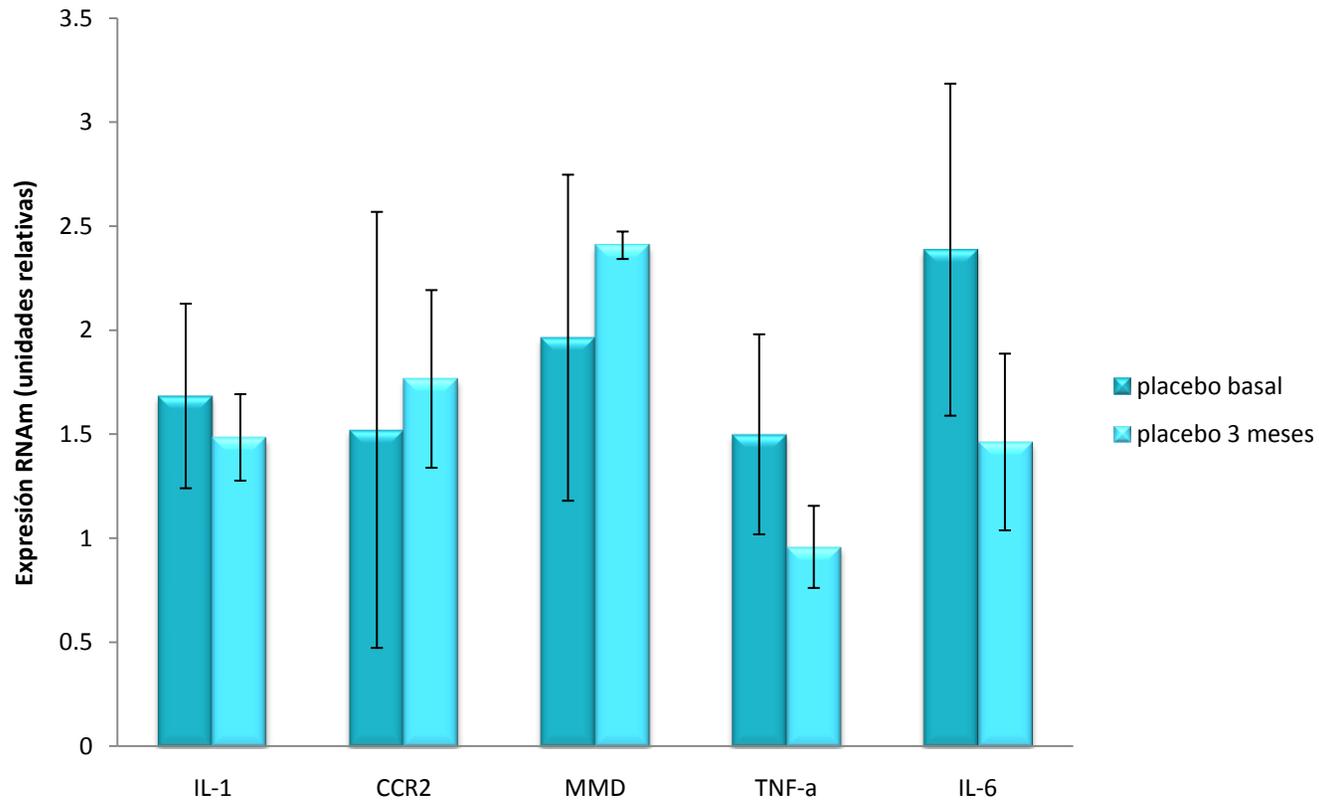


Gráfica 4: Expresión de moléculas que participan en procesos inflamatorios a los 3 meses de suplementación del grupo placebo (n = 14) y con tratamiento (n = 16) con ácidos grasos omega 3. Los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β 2-microglobulina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Student*. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). *P < 0.05 Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Con respecto al grupo placebo, se comparó la expresión al tiempo 0 y a los 3 meses de la suplementación para determinar si hubo algún efecto del placebo dentro de este grupo. Los resultados de la gráfica 5 indican que en este caso la expresión de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α permaneció igual. Sin embargo, el RNAm del marcador CCR2 aumentó significativamente ($P < 0.05$) a los 3 meses de consumir el placebo. En este caso, los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β -actina. Además, el marcador de diferenciación de macrófagos (MMD) tiene tendencia significativa ($P = 0.07$) a aumentar al final de la suplementación. Este efecto no se observó cuando los datos de expresión se normalizaron con el gen de referencia β 2-microglobulina, probablemente a una mayor variación que muestra este gen de referencia (gráfica 6).

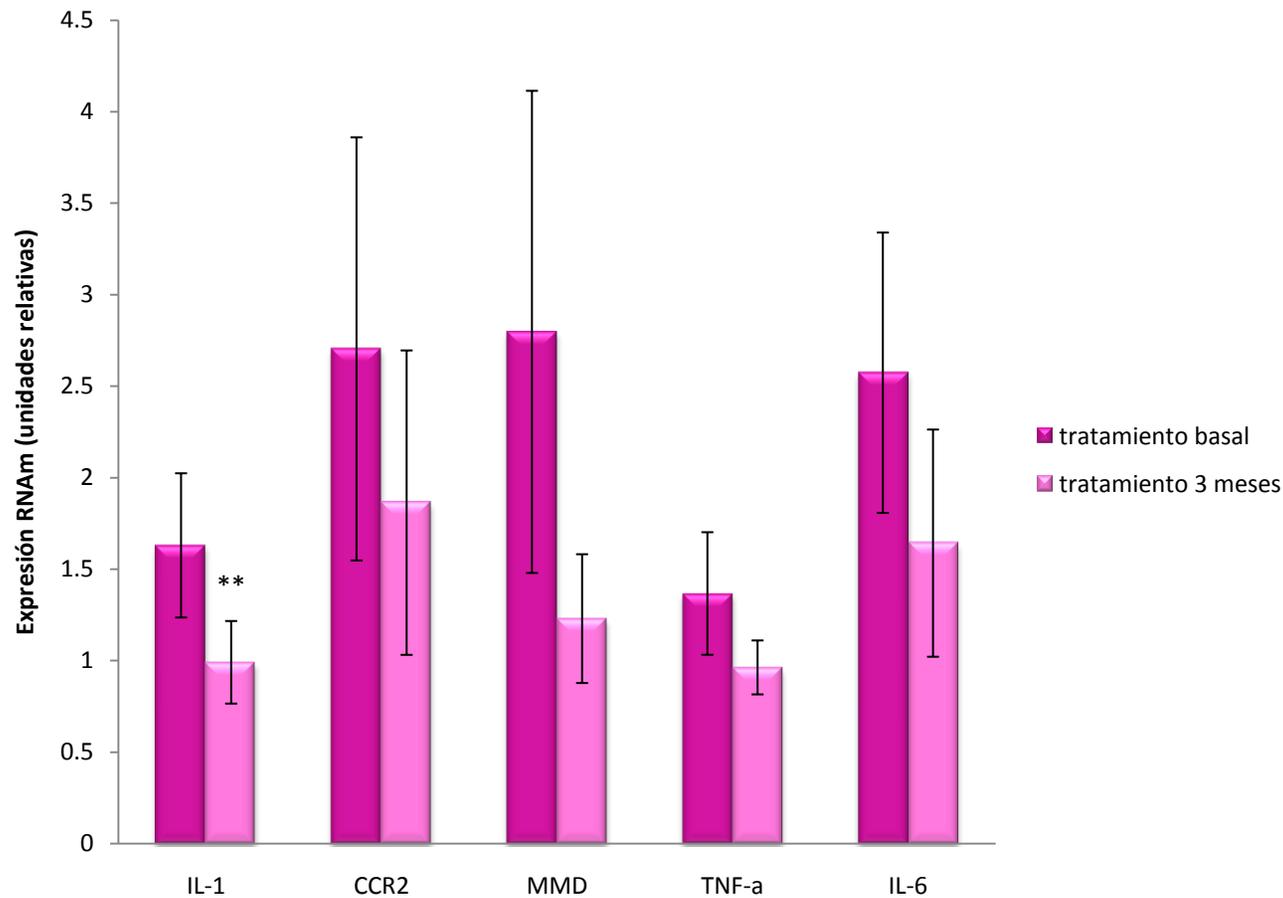


Gráfica 5: Expresión de moléculas que participan en procesos inflamatorios al tiempo basal y a los 3 meses de recibir el placebo (N = 14), los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β -actina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Parada* Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). *P < 0.05 **P = 0.07 tendencia. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

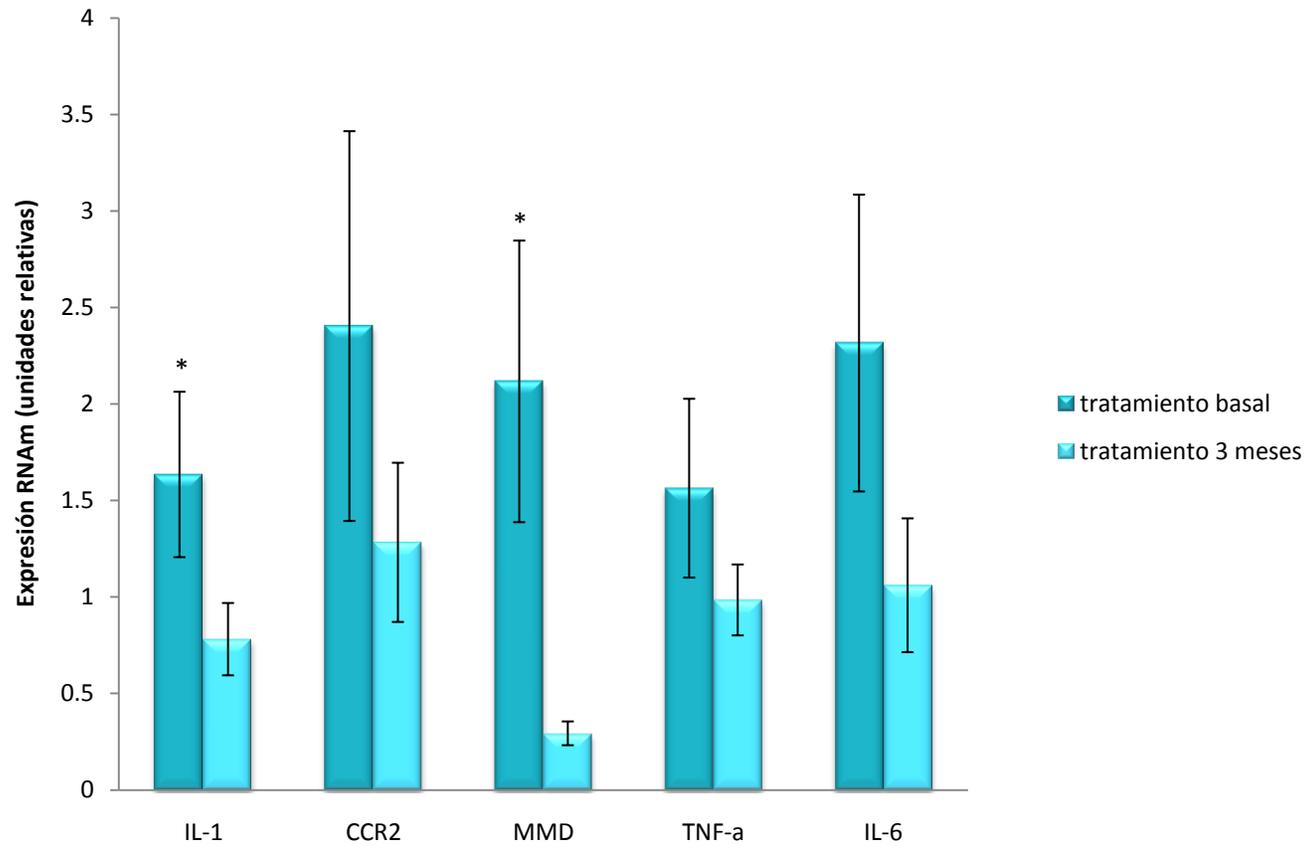


Gráfica 6: Expresión de moléculas que participan en procesos inflamatorios al tiempo basal y a los 3 meses de recibir el placebo (N = 14), los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β --microglobulina. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Parada*. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

El último análisis corresponde a lo ocurrido en el grupo con tratamiento. En la gráfica 7, se observa la expresión basal (tiempo 0) y a los 3 meses de la suplementación con ácidos grasos omega 3. Para determinar el efecto de estos ácidos grasos se comparó la expresión al final del tratamiento con la basal, los valores se normalizaron con β -actina y los resultados muestran tendencia en la disminución de la expresión del gen IL-1. Sin embargo, al normalizar con el segundo gen de referencia β 2-microglobulina (gráfica 8), se observa que la expresión tanto de IL-1 como del marcador de macrófagos (MMD) presentó una disminución significativa ($P < 0.05$), 3 meses después del tratamiento con ácidos grasos omega 3.



Gráfica 7: Expresión de moléculas inflamatorias antes y después del tratamiento con ácidos grasos omega 3 (N = 16). Todos los sujetos recibieron 1.2 g/día de omega 3. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Parada*. Los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β -actina. Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6). **P = 0.08 tendencia. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.



Gráfica 8: Expresión de moléculas inflamatorias antes y después del tratamiento con ácidos grasos omega 3 (N = 16). Todos los sujetos recibieron 1.2g/día de omega 3. La comparación entre ambos grupos se determinó mediante una *t-Parada*. los valores de expresión se normalizaron con el gen de referencia β --microglobulina Interleucina 1 (IL-1), quimiocina del receptor 2 del motif C-C (CCR2), diferenciación asociada de monocitos a macrófagos (MMD), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6).*P < 0.05. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Discusión de Resultados

El presente estudio se realizó para evaluar el efecto de la suplementación con ácidos grasos omega 3 sobre la expresión de moléculas involucradas en un estado de inflamación crónica de grado leve como es la obesidad. El tejido adiposo secreta citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α). Además, se infiltran a este tejido monocitos y macrófagos, los cuales tienen marcadores específicos como CCR2 y MMD que pueden indicar el estado de inflamación.¹² La expresión de estas citocinas tienen una función importante para desencadenar alteraciones metabólicas como es la diabetes mellitus.⁵

Dado el estado inflamatorio de la obesidad, la suplementación con anti-inflamatorios como los ácidos grasos omega 3 resulta una estrategia útil para disminuir dicho estado, principalmente en sujetos jóvenes con la finalidad de disminuir complicaciones en edades adultas.

En general ambos grupos (placebo y tratamiento con ácidos grasos omega 3) presentan un estado inflamatorio similar al inicio del estudio, resultando en resistencia a la insulina. En algunos casos, los niveles del RNAm de las moléculas inflamatorias fueron significativos solo cuando se normalizó con uno de los genes de referencia (β 2 microglobulina y β -actina). Esta discrepancia podría deberse a la variabilidad propia de los genes de referencia que se utilizaron,⁴⁸ esto demuestra la necesidad de utilizar más de uno de estos⁴⁷ para tener una mejor certeza de los resultados. A pesar de tener diferentes niveles de estabilidad, con los resultados

obtenidos se puede determinar que ambos genes de referencia muestran en general la misma tendencia en la expresión de los genes estudiados. Esto se observa claramente en la concordancia de la expresión significativa de los genes CCR2 y MMD después de haber recibido el tratamiento con ácidos grasos omega 3 durante 3 meses en comparación con el placebo, cuando los datos se normalizaron con ambos genes de referencia.

Nuestros resultados muestran el efecto anti-inflamatorio de los ácidos grasos omega 3, tal y como se observó en la disminución de la expresión del marcador de diferenciación asociado de monocitos a macrófagos (MMD) y CCR2 a los 3 meses de su suplementación con respecto a los que recibieron placebo. Estos hallazgos son consistentes con la disminución en la cantidad del RNAm de las moléculas inflamatorias IL-1 y MMD en el grupo con tratamiento a los 3 meses, respecto al inicio de éste. En el tejido adiposo, la inflamación no solo es producida por macrófagos maduros, sino que también participan monocitos. El gen CCR2 está encargado de reclutar más monocitos y macrófagos y es responsable del desarrollo de la obesidad, inflamación de tejido adiposo, resistencia a la insulina y controlar la conducta alimentaria.²⁹ CCR2 también participa de manera importante reclutando macrófagos así que la acción de los ácidos grasos omega 3 podría también disminuir la expresión de receptores quimioatrayentes. Así que, la disminución en la expresión de CCR2 podría disminuir la cantidad de monocitos en el tejido adiposo y por ende habrá una menor cantidad de macrófagos que secreten moléculas proinflamatorias (IL-1).

El marcador de inflamación CCR2 se expresa en monocitos y macrófagos, MMD se expresa únicamente en macrófagos maduros¹⁶ cuando se produce una respuesta inflamatoria. El tejido adiposo tiene macrófagos residentes de manera habitual, pero cuando se presenta un estado inflamatorio el reclutamiento de células del sistema inmune incrementa. En estas condiciones el número de macrófagos presentes en el tejido adiposo correlaciona positivamente con el índice de masa corporal.⁵¹ Los marcadores inflamatorios encontrados en circulación pueden proporcionar un reflejo de lo que ocurre en el tejido adiposo, ya que cuando se produce inflamación existe migración de moléculas presentes en el sistema vascular y esto resulta en un daño endotelial.⁴³ La célula vascular dañada inicia una reacción inflamatoria liberando factores vasoactivos (como óxido nítrico). Estos factores junto con un cambio de moléculas de adhesión presentes en la superficie celular atrae leucocitos (incluyendo a los monocitos) circulantes que se unen al endotelio atravesando la pared vascular, y particularmente en la interacción leucocito-endotelio se produce en distintas etapas incluyendo la migración y liberación de factores solubles (citocinas inflamatorias). La consecuencia de este proceso vascular es caracterizada por la acumulación de macrófagos tisulares en el tejido adiposo.⁵² De manera que la presencia de leucocitos en circulación podría ser un reflejo del estado inflamatorio del individuo.⁵³ Las proteínas inflamatorias pueden ser liberadas a la circulación y es este factor el que contribuye a una inflamación crónica de grado leve asociada con resistencia a la insulina.⁵¹

Existen evidencias en las que se ha medido la concentración de citocinas (TNF- α e IL-6) circulantes y su expresión en tejido adiposo después de una intervención (entrenamiento físico, dietaria o suplementación con ácidos grasos omega 3) que muestran resultados controversiales respecto al efecto sobre estas moléculas proinflamatorias.⁵⁴ Sin embargo, no se ha evaluado la expresión a nivel de RNAm de las citocinas en células circulantes que participan en procesos inflamatorios.

Diversos estudios han demostrado cambios en la expresión de las citocinas a nivel proteico en tejido adiposo, pero no en circulación suplementando con distintas dosis de ácidos grasos omega 3 y en diferentes periodos de tiempo (de 1 a 3 meses). Los resultados son controversiales, ya que algunos de ellos observan un efecto positivo y otros estudios reportan que este tipo de ácidos grasos no tienen ningún efecto sobre las citocinas.⁴² Nuestros resultados muestran que a nivel de expresión, el transcrito de las citocinas IL-6 y TNF- α expresados en células circulantes no se modificó después del tratamiento con los ácidos grasos omega 3. En otro estudio, se ha encontrado que en adolescentes la suplementación con 1.2 g/d por 3 meses disminuye la concentración de citocinas proinflamatorias circulantes.³⁹ Por otro lado, estudios realizados en adultos con dosis mayores (3.36 g/d) durante 2 meses han mostrado una disminución en la concentración y en la expresión de las proteínas proinflamatorias provenientes de tejido adiposo. Esto sugiere que deben considerarse tanto la dosis y el tiempo de suplementación para inhibir la transcripción de las moléculas inflamatorias.⁴¹ Probablemente para observar un mayor cambio en la expresión de estas citocinas se debería de suplementar con ácidos grasos omega 3 a una dosis mayor y durante un tiempo

más amplio y de esta manera disminuya la inflamación del tejido adiposo y por lo tanto una disminución en la expresión de los marcadores inflamatorios.

También debe considerarse que la controversia de los distintos resultados en cuanto a las moléculas inflamatorias circulantes, posiblemente se debe a que éstas además de provenir del tejido adiposo, entre un 15 a un 35% son producidas por otros tejidos.⁵⁴ Además, el tejido adiposo y los macrófagos tienen funciones similares, destacando la más importante la secreción de proteínas, por lo tanto es posible que la dosis de ácidos grasos omega 3 suplementados no fuera suficiente, ni tampoco el tiempo adecuado para observar una disminución en la expresión de los marcadores inflamatorios.⁵¹ Es decir, además de la secreción de citocinas por el tejido adiposo, los macrófagos presentes también pueden llegar a secretar las citocinas, por lo tanto el gen de estos marcadores proinflamatorios siempre se encontrara en niveles de expresión elevados.

Por lo tanto, se propone que para futuras investigaciones convendría hacer un estudio en el que se evalúe la expresión del RNAm y la cuantificación de las proteínas proinflamatorias en suero para hacer una asociación entre la secreción de la proteína y la expresión de su gen. Esto permitirá explorar a qué nivel podrían estar actuando los ácidos grasos omega 3, ya sea a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional.

Nuestra propuesta del papel de los ácidos grasos omega 3 en la disminución de la expresión de los genes relacionados con inflamación en células circulantes, se basa también en los resultados observados en el grupo placebo. En este grupo, la

expresión de las citocinas proinflamatorias al tiempo 0 y a los 3 fue similar. Sin embargo, en el caso de los marcadores CCR2 y MMD se observó un aumento en dicha expresión al finalizar el tiempo de suplementación con el placebo, sugiriendo que el placebo no tiene ningún efecto en la disminución de las moléculas inflamatorias.

Para determinar si los ácidos grasos omega 3 ejercieron algún efecto en valores antropométricos y bioquímicos, éstos se registraron al tiempo 0 y a los 3 meses de suplementación de cada grupo de estudio. Respecto al peso no existen diferencias entre los tiempos, consecuentemente el IMC continuó indicando valores de obesidad y superando la percentila 95 al final de la suplementación. Estos resultados son similares a los obtenidos por López Alarcón y col.⁴⁰, en donde no observan diferencia en el peso corporal antes y un mes después de la suplementación con 900 mg/d de aceite de pescado en niños y adolescentes. La concentración de glucosa se encuentra dentro de valores normales, pero en todos los casos, los sujetos presentan hiperinsulinemia. La hiperinsulinemia podría provocar la resistencia a la insulina (HOMA > 3.16). La concentración elevada de insulina en ayuno indican una inadecuada captación de glucosa, por lo tanto no pueden contrarrestar la resistencia a la insulina que presentan, y tienen un riesgo elevado de desarrollar alteraciones metabólicas irreversibles de no intervenir oportunamente.³⁸ Estos resultados concuerdan con el hecho de que los niveles de expresión de las citocinas proinflamatorias sigan elevados, porque la condición inflamatoria de tejido adiposo sigue presente de manera importante.

Es importante resaltar, que a pesar de que no encontramos diferencia significativa en la expresión de genes inflamatorios con la dosis de 1.2 g/d de ácidos grasos omega 3, si disminuyó la expresión de los genes MMD y CCR2, los cuales son importantes para la diferenciación y maduración del macrófago.¹⁶

Como se mencionó anteriormente, éste estudio forma parte de un protocolo de investigación muy ambicioso, por lo que nuestros resultados tienen un aporte importante en la exploración de otros genes diferentes a las citocinas como MMD y CCR2 que también son blanco del efecto de los ácidos grasos omega 3. Es trascendental mencionar que el análisis de estas moléculas fue posible en células circulantes, las cuales nos reflejan el estado inflamatorio general del individuo. Aunque éstas no indican con precisión el estado inflamatorio del tejido adiposo. Este tipo de estudios es necesario para explorar nuevos mecanismos de acción de ácidos grasos omega 3, en el que se consideren otras moléculas que regulen la proliferación de células circulantes secretoras de citocinas.

Conclusiones

- La suplementación (1.2g/d) con ácidos grasos omega 3 durante 3 meses, no disminuye la expresión del RNAm de las citocinas proinflamatorias, IL-6 y TNF- α de leucocitos de adolescentes obesos con resistencia a la insulina.
- La suplementación (1.2g/d) con ácidos grasos omega 3 durante 3 meses, disminuye la expresión de los genes IL-1, CCR2 y MMD de leucocitos de adolescentes obesos con resistencia a la insulina.

Bibliografía

- 1) **Friгоlet Vázquez-Vela M**, Torres N, Tovar A, (2008), White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity, Archives of Medical Research, vol. 39, num. 8, pags: 715-728
- 2) **Zhang Y**, Zeng X, Jin S, (2012), Autophagy in adipose tissue biology, Pharmacological Research, vol. 66, num. 6, pags: 505-512
- 3) **Yarak S**, Okamoto O, (2010), Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives, Anais Brasileiros de Dermatología, vol.85, num.1, pags: 647-656
- 4) **Miján de la Torre Alberto**, Técnicas y Métodos de investigación en nutrición humana, Editorial Giosa, Barcelona 2002, pags: 199-219
- 5) **Goosens G**, (2007), The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance, Physiology and Behavior, vol. 94, num. 2, pags: 206-218
- 6) **Salles J**, Tardif N, Landner J, Mothe-Satney I, Guillet C, Boue-Vaysse C, Combaret L, Giraudet C, Patrac V, Bertrand-Michel J, Denis P, Chardigny J, Boirie Y, Walrand S, (2012), TNF- α gene knockout differentially affects lipid deposition in liver and skeletal muscle of high fat diet mice Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 23, num. 12, pags: 1685-1693
- 7) **Adamczak M**, Wiecek A, (2013), The adipose tissue as an endocrine organ, Seminars in Nephrology, vol 33, num. 1, pags: 2-13
- 8) **Welsch S**, Histología, Editorial Médica Panamericana, España 2009, pág. 147
- 9) **Jacobi D**, Stanya K, Lee C, (2012), Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity, vol.1, num. 1, pags: 4-12
- 10) Organización Mundial de la Salud www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/ 11 agosto de 2013 20:29 pm
- 11) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. www.ensanut.insp.mx 11 agosto de 2013 20:26 pm
- 12) **Ginninni C**, Giorgis T, Scarinci A, Ciampani M, Marcovecchio M, Chiarelli F, Mohn A, (2008), Obese related effects of inflammatory markers and insulin resistance on increased carotid intima media thickness in pre-pubertal children, Atherosclerosis, vol. 197, num. 1, pags: 448-456

- 13) **Ottavianni E**, Malagoli D, Franceschi C, (2011), The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma, *General and Comparative Endocrinology*, vol. 174, num. 1, pags: 1-4
- 14) **Ye J**, (2009), Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance, *International Journal of Obesity*, vol. 33, num. 1, pags: 54-66
- 15) **Bastarrachea R**, López-Alvarenga J, Bolado-García V, Tellez J, Laviada H, Comuzzi A, (2007), Macrófagos, Inflamación, Tejido Adiposo, Obesidad y Resistencia a la Insulina, *Gac Med Mex*, vol. 143, num. 6, pags: 505-512
- 16) **Liu Q**, Zheng J, Yin D, Xiang J, He F, Wong Y, Lining L, Qin H, Liu L, Liang Y, Huan H, (2011), Monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD) positively regulates Erk and Akt activation and TNF- α , NO production in macrophages, *Molecular Biology Rep*, vol. 39, num. 5, pags: 5643-565
- 17) **Dinarello C**, (2000), Proinflammatory Cytokines, Impact of basic research on tomorrow's medicine, *Journal Publications Chestnet*, vol. 118, num. 2, pags: 503-508
- 18) **Wolf J**, Weinberger B, Arnold C, Majer A, Westendorp R, Giru beck-Loebenstein B, (2012), The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts, *Experimental Gerontology*, vol. 47, num. 9, pags: 749-753
- 19) **Anaya J**, (2003), Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología*, vol. 19, num. 2, pags: 112-120
- 20) **Zamora- Valdés D**, Chávez-Tapia N, Mendez-Sánchez N, (2004), Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina, *Sociedad de México Medica Sur*, vol. 11, num. 3, pags: 149-159
- 21) **Moreno Basilio**, La Obesidad en el Tercer Milenio, año 2006, Editorial Panamericana, 3ª edición, Buenos Aires Argentina, pag: 26
- 22) **Tilg H**, Moschen A, (2008), Inflammatory Mechanisms in the regulation of Insulin Resistance *Molecular Medicine*, vol. 14, num. 3-4, pags: 222-231
- 23) **Kaplanski G**, Marin V, Montero-Julian F, Montovani A, Farnaviev C, (2003), IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation, *Trends in Immunology*, vol. 24, num. 1, pags: 25-29
- 24) **Chiarelli F**, Marcovecchio M, (2008), Insulin resistance and obesity in childhood, *European Journal of Endocrinology*, vol. 159, num. 1, pags: 67-74
- 25) **Sánchez-Muñoz F**, García-Macedo R, Alarcón-Aguilera F, Cruz M, (2005), Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune, *Gac Med Mex*, vol. 141, num. 06, pags: 505-512

- 26) **Sommer C**, Kress M, (2004), Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia, *Neuroscience Letters*, vol. 361, num. 1-3, pags: 184-187
- 27) **Pérez de Heredia F**, Mujico J, Gómez- Martínez S, Marcos A, (2012), Malnutrition and Inflammation, *Inflammation, Chronic Diseases and Cancer, Cell and Molecular Biology*, vol. 1, num. 1, pags: 357-375
- 28) **Hernández A**, Tratado de Nutrición Bases de Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición, Editorial Panamericana, 2ª edición, España 2010, pag: 60
- 29) **Capurso C**, Capurso A, (2012), From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids, *Vascular Pharmacology*, vol. 57, num, 2-4, pags: 91-97
- 30) **Wellen K**, Hotamisligil G, (2005), Inflammation, stress and diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, num. 5, pags: 1111-1119
- 31) **Novak T**, Babcock T, Jho D, Helton W, Espat N, (2003), NF- κ B inhibition by ω 3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription, *American Journal Lung Cell Molecular Physiology*, vol. 284, num. L84-L89, pags: 84-89
- 32) **Rodríguez-Cruz M**, Tovar A, del Prado M, Torres N. (2005) Mecanismos Moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud, *Revista de investigación clínica*, vol. 57, num. 3 pags: 457-472.
- 33) **Velásquez G**, (2006), Fundamentoos de alimentación saludable, Editorial Universidad de Antioquia, Medellin Colombia, 1ª edición, pags: 45-50
- 34) **Coronado-Herrera M**, Vega y León S, Gutiérrez R, García-Fernandez B, Díaz-González G, (2006), Los ácidos grasos omega 3 y omega 6. *Nutrición, Bioquímica y Salud*, Departamento de Sistemas Biológicos UAM, vol.23, num.3, pags: 72-79
- 35) **Fan C**, Zirpoli H, Qi K, (2013), n-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress, *Current Opinion of Clinical Nutrition*, vol. 16, num. 2, pags: 124-132
- 36) **Calder P**, (2006), n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diaseases, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, num. 6, pags: 1505-1519
- 37) **Kalupahana N**, Claycombe K, Moustaid-Moussa N, (2011), (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights, *American Society for Nutrition*, vol. 2, num. 4, pags: 304-316
- 38) **Kaur S**, Oddos T, Tucker-Samaras S, Southall M, (2008), Regulation of DNA Repair Process by the Pro-Inflammatory NF- κ B Pathway, *INTECH Open Science*, vol. 1, num.8, pags: 213-227

- 39) **Dangardt F**, Osika W, Chen Y, Nilson U, Gan Li, Gronowitz E, Strandvik B, Friberg P, (2010), Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents, *Atherosclerosis*, vol. 212, num. 2, pags: 580-585
- 40) **López-Alarcón M**, Martínez-Coronado A, Velarde-Castro O, Rendón-Macías E, Fernandez J, (2011), Supplementation of n3 long chain polyunsaturated fatty acid synergistically decreases insulin resistance with weight loss of obese prepubertal and pubertal children, *Archives of Medical Research*, vol. 42, num. 6, pags: 502-508
- 41) **Itariu B**, Zeyda M, Hochbrugger E, Neuhofer A, Prager G, Schindler K, Bohdjalian A, Mascher D, Vangala S, Schronz M, Krebs M, Bischof M, Stulnig T, (2012), Long chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 96, num. 5, pags: 1137-1149
- 42) **Munro I**, Garg M, (2011), Dietary supplementation with long chain omega 3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults, vol. 7, num. 3, pags: 173-181
- 43) **Shoelson S**, Jongsoon L, Goldfine A, (2006), Inflammation and Insulin Resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, num. 7, pags: 1793 - 1801
- 44) **Keskin M**, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C, (2005), Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents, *Pediatrics*, vol. 115, num. 4, pags: 500-503
- 45) **CDC**, (2002), 2000 CDC Growth Charts for the United States: Methods and Development Vital and Health Statistics, vol. 11, num. 146, pags: 10,31,32
- 46) **Chomczynski P**, Sacchi N, (2006) The single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nature Protocols* vol. 1, num. 2. Pags: 581-585
- 47) **Zavaleta M**, Yaya-Lancheros M, Chaparro-Giraldo, (2008), Comparación de dos kits de RT-PCR en la detección de ARNm de dos genes endógenos de papa, *Revista Colombiana de Biotecnología*, num. 2, pags: 104-110
- 48) **Vandosompele Jo**, Preter K, Pattyh F, Popper B, Van-Roy N, Paepe A, Speleman F, (2002), Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, vol. 3, num. 7, pags: 1-12

- 49) **Plaffl MW**, (2001), A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR, *Nucleic Acids, Res.* vol. 29, num. 9, pags: 2002-2007
- 50) **Yuan JS**, Reed A, Chen F, Stewart CN, (2006), Statistical analysis of real time PCR data, *BMC Bioinformatics* vol. 85, num. 7, pags: 5-12
- 51) **Wellen K**, Hotamisligil G, (2005), Inflammation, stress, and diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, vol.115, num. 5, pags: 1111-1119
- 52) *Biología Vascular e inflamación* www.cnic.es/es/inflamación/ 3 agosto de 2013 10:50 pm
- 53) **Rodríguez G**, Mago N, Rosa F, (2009), El papel de la inflamación en la aterogénesis, *Investigación Clínica* vol. 50, num. 1, pags: 109-129
- 54) **Leggate M**, Carter W, Evans M, Vennard R, Sundaram S, Nimmo N, (2012), Determination of inflammatory and prominent proteomic changes in plasma and adipose tissue after high-intensity intermittent training in overweight and obese males, *Journal of Applied Physiology*, vol. 112, num. 8, pags: 1353-1360

Anexos

I. Extracción de RNA total a partir de leucocitos (Método Chomczynski)⁴⁵

1. Centrifugar tubo con sangre aproximadamente 5 mL, a 3500 rpm, 10 min y 4°C.
2. Quitar el suero y extraer 500 µL de leucocitos y colocarlos en un microtubo (sin importar que vayan acompañados de eritrocitos).
3. Agregar 1 mL de Trizol, agitar en el vortex de 4 ó 5 veces. Dejar incubar 5 min en hielo.
4. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Separar el sobrenadante y agregar 200 µL de cloroformo frío, agitar 15 seg vigorosamente. Dejar incubar 2-3 min en hielo.
6. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min a 4°C. Separar la fase acuosa en otro microtubo y agregar 500 µL de isopropanol frío para precipitar el RNA.
7. Incubar a -70°C por 24 horas.
8. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min a 4°C, quitar el sobrenadante dejando solo el botón, esperar a que se seque.
9. Al botón seco se le agrega 50 µL de la siguiente mezcla que contiene DNasa:

Reactivo	Volumen
H ₂ O grado biología molecular	43 µL
Buffer de incubación	5.0 µL
DNasa	1.5 µL
Inhibidor de RNasa	0.5 µL

10. Incubar de 30-37°C por 20 minutos.
11. Agregar 750 µL de Trizol, agitar en el vortex.
12. Agregar 150 µL de cloroformo frío, agitar 15 segundos vigorosamente. Dejar incubar 2-3 minutos en hielo.
13. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Separar la fase acuosa y pasarla a un microtubo, agregar 500 µL de isopropanol frío.
14. Dejar precipitar el RNA a -70°C por 24 horas.
15. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, quitar el sobrenadante dejando solo el botón.
16. Agregar 500 µL de etanol al 75% para lavar el RNA, desprendiendo el botón (no se disuelve), agitar levemente con la mano.
17. Centrifugar a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, quitar el sobrenadante dejando solo el botón.
18. Disolver el botón en agua grado biología molecular (aproximadamente 30 µL)
19. Cuantificar y determinar la integridad del RNA.

II Síntesis de la primera cadena de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total en un volumen final de reacción de 50 µL. La reacción se llevó a cabo en un microtubo de 0.2 ml (marca Axygen) libre de nucleasas manteniéndolo en baño de hielo. Se preparó una mezcla con los siguientes reactivos:

5 µL de Buffer 10X RT
11 µL de MgCl₂ 25 mM
10 µL de la mezcla de dNTP's (10 Mm de cada uno: dATP, dGTP, dCTP y dTTP en pH neutro)
2.5 µL de oligo dT primer 50 nm
1 µL de inhibidor de ribonucleasas 5 nm
Añadir 1.25 µL de la transcriptasa reversa (Taqman[®]) y mezclar con la micropipeta
Agregar 18.25 mL de agua libre de nucleasas.

Para preparar cada reacción se colocó en cada tubo los siguientes reactivos:

1. RNA total
2. La mezcla de reacción contiene la cantidad de agua suficiente para completar un volumen final de 50 µL. En cada tubo fue diferente el volumen que se agregó de esta mezcla, ya que para ajustar la concentración de la reacción a 1 µg/ml indica que cada tubo tiene proporciones diferentes pero el volumen final y la concentración es la misma en todos los casos.

Finalmente, todos los tubos se colocan en el termociclador (Biometra, Thermocycler) y se programaron a las siguientes temperaturas:

65° C	5 minutos
37° C	2 minutos
25° C	10 minutos
37° C	50 minutos
70° C	15 minutos

III PCR Punto Final

La PCR se realizó en microtubos de 0.2 ml (marca Axigen) nuevos y libres de nucleasas. La amplificación se lleva a cabo en presencia de los siguientes componentes (Invitrogen™ life Technologies):

1. Amortiguador para PCR 10x	2.5µL
2. Mezcla de dNTPs	1.0 µL
3. MgCl ₂ 50 nM	0.75 µL
4. Forward primer F 20 pM/µL	1.0 µL
5. Reverse primer R 20 pM/µL	1.0 µL
6. cDNA	2.0 µL
7. Taq DNA polimerasa (5U/µL)	0.2 µL
8. Agua grado Biología Molecular	16.55 µL

Tapar los tubos y centrifugar brevemente para coleccionar toda la mezcla en el fondo. Incubar los tubos en un termociclador (Biometra, Thermocycler) bajo las siguientes condiciones de reacción:

1. 95° C por 5 minutos para desnaturalizar completamente el cDNA.
2. 64° C por 1 minuto para alinear los primers del gen en estudio.
3. 72° C por 90 segundos para la extensión del amplicón.

Realizar 33 ciclos de amplificación de las siguientes temperaturas como sigue:

95° C por 1 minuto

64° C por 1 minuto

72° C por 90 segundos

Y un ciclo final de:

95° C por 1 minuto

64° C por 1 minuto

72° C por 7 minutos

Nota: Durante la preparación de la mezcla de reacción, los reactivos y las muestras se deben mantener en hielo.

IV PCR EN TIEMPO REAL

La PCR en tiempo real cuantitativo es un método útil para la detección y medida de productos generados durante cada ciclo de PCR que son directamente proporcionales a la cantidad de templado antes de iniciar el proceso de PCR.

MATERIAL

- Equipo Light Cycler Nano
- Software Light Cycler® Nano Software 1.0
- Tubos Light Cycler Tube Strips
- Centrifuga Beckman Coulter

REACTIVOS

- SYBR Green Fast Start Essential DNA green master
- Agua grado biología molecular
- Primers

PROTOCOLO DE LA REACCION DE qPCR

Preparar la mezcla de reacción para la PCR (para una reacción estándar de 10 μL) en un microtubo de 1.5 ml colocado en hielo, al cual se le agregan los siguientes componentes:

Componente	Volumen (μL)
Agua grado PCR	1.5 μL
Forward gen blanco F 20 pM/ μL	0.5 μL
Reverse gen blanco R 20 pM/ μL	0.5 μL
Master Mix concentración 5X	5 μL
Mix cDNA	2.5 μL

- Cerrar los tubos con su tapa.
- Colocar los adaptadores con los tubos y centrifugar menos de un minuto.

Para el análisis de la cuantificación relativa se utilizó el método $\Delta\Delta\text{Cp}$, en el cual, la expresión de un gen blanco se normaliza contra un gen de referencia no regulado, este gen deberá estar presente en todas las células nucleadas y la síntesis del RNAm se considera estable y segura en el tejido a estudiar, aún bajo el tratamiento experimental.^{48,49} Los genes endógenos o de referencia utilizados fueron β -actina y β -2 microglobulina y los genes blanco (IL-1, IL-6, TNF- α , MMD y

CCR2). Este método es derivado del modelo de eficiencia calibrada cuya fórmula es la siguiente:

$$\text{PROPORCIÓN} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta C_{p_{\text{blanco}}}}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta C_{p_{\text{referencia}}}}}$$

Donde:

E= la eficiencia amplificación

ΔC_p para cada gen (referencia o blanco) se obtiene de:

$$\Delta C_{p_{\text{blanco}}} = C_{p_{\text{blanco}}} - C_{p_{\text{tratadas}}}$$

$$\Delta C_{p_{\text{referencia}}} = C_{p_{\text{control}}} - C_{p_{\text{tratadas}}}$$

En el método $\Delta\Delta C_p$ se considera que la eficiencia del gen blanco (E_{blanco}) como del gen control ($E_{\text{referencia}}$) son iguales a 2, obtenemos la siguiente fórmula:

$$\text{PROPORCIÓN} = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{\text{referencia}}} - \Delta C_{p_{\text{blanco}}}$$