



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA CANTIDAD Y TIPO DE ÁCIDOS GRASOS SOBRE LA OXIDACIÓN
DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS GRASOS EN RATONES KNOCK-OUT DEL
RECEPTOR PPAR-ALFA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. VALERIA LOPEZ SALAZAR

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador
Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México, agosto 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“No te rindas, aún estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras,
enterrar tus miedos,
liberar el lastre,
retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros
y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero,
porque existe el vino y el amor, es cierto;
porque no hay heridas que no cure el tiempo.*

*Abrir las puertas,
quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron,
vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa,
ensayar un canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos.*

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños
porque cada día es un comienzo nuevo,
porque esta es la hora y el mejor momento;
porque no estás solo, porque yo te quiero”*

Mario Benedetti

Este trabajo esta dedicado a la gente que más me gusta...

A mi madre Carmen Salazar Mendoza por su inmenso e invaluable amor, por ayudarme a vencer los miedos e impulsarme siempre a continuar “arriba y adelante”. A mi padre Andrés López Valdez por su infinito cariño y enseñanzas.

A mis hermanas, Andrea, Fernanda y Fátima, gracias por todos los buenos momentos compartidos, por su gigantesco e inmutable amor, por ser mis inseparables amigas, una fuente eterna de felicidad en mi vida. A Andrea, por ser un ejemplo de perseverancia, fortaleza y dedicación. A Fernanda por los momentos llenos de risas y diversión. A Faty, mi adoración e inspiración, por ser mi cómplice y confidente, por hacer de la vida un lugar mejor.

A Donovan Correa Gallegos, el individuo que con su amor revolucionó mi mundo, por que a su lado el desánimo se convierte en optimismo y el miedo en osadía, por ser la persona que marcó un antes y un después en mi vida.

A la familia, abuela, tíos, tías y primos aquellos que me brindaron apoyo y fueron testigos de mi crecimiento y formación. A los que se fueron pero siempre recordaremos con cariño.

A la amistad, que viene en diferentes presentaciones, amigos de siempre Fernando Soto, Edder Hernández, Julieta Arellano, Francisco Macías, Elizabeth López, Antonio Romano, Elizabeth Ibarra, German Morales, Itztli Trejo, Rosalía Hernández, Nelly Tiempos y recientes, Ariana Vargas, Mónica Sánchez, Sandra Tobón, Sofía Mata, Saira López, Claudia Márquez, Miriam Radyx.

Agradecimientos académicos

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la entidad responsable de mi desarrollo y crecimiento académico, por brindarme grandiosas oportunidades y experiencias; la excelente preparación y formación que me permitió llegar hasta este nivel de estudios. Por ser el espacio donde se forma el criterio, se genera y se fortalece el desarrollo de las ciencias.

A mi tutora la Dra. Nimbe Torres y Torres por la invaluable asesoría y apoyo durante el desarrollo de este proyecto, por brindarme la oportunidad y confianza de trabajar en su grupo de trabajo. Al Dr. Armando Tovar Palacio por sus valiosas enseñanzas, ideas y respuestas a las complicaciones que surgieron durante la elaboración del proyecto.

A los miembros del comité tutor, al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg por las aportaciones y consejos que durante estos años enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Dra. Cristina Fernández Mejía y Dr. Jaime Mas Oliva por sus comentarios críticos y observaciones para mejorar este trabajo.

Agradezco a los investigadores, amigos y compañeros del Departamento de Fisiología de la Nutrición en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición por hacer del laboratorio un excelente lugar de trabajo. Al QFB Guillermo Ordaz Nava por el soporte técnico y al estudiante de Medicina Joshua Acevedo Carabantes por su participación en el trabajo experimental.

Al CONACYT por las beca de estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para asistir al 12th FENS European Nutrition Conference 2015.

“Por mi raza hablara el espíritu”.

Abreviaturas

AC	aceite de coco
ACC	acetil-coenzima A carboxilasa
ACOX1	acil-coenzima A oxidasa peroxisomal 1
AGCM	ácidos grasos de cadena media
AGM	ácidos grasos monoinsaturados
AGP	ácidos grasos poliinsaturados
AGS	ácidos grasos saturados
AO	aceite oleico
AS	aceite de soya
AUC	área bajo la curva
CPT1	carnitina palmitoil transferasa 1
DBD	dominio de unión a ADN
DHA	ácido docosaheptaenoico
EDAA	enzimas degradadoras de aminoácidos
EPA	ácido eicosapentaenoico
FAS	ácido graso sintasa
HAL	histidina amonio liasa
HDL	lipoproteína de alta densidad
HNF4 α	factor nuclear hepático 4 α
K _d S	constantes de disociación
KO PPAR α	ratones "knockout" de PPAR α
LBD	domino de unión a ligando
LDL	lipoproteína de baja densidad
m36B4	proteína ribosomal larga PO
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGC1 α	coactivador del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma 1 α
PPAR α	receptor activado por proliferadores de peroxisomas α
PPAR γ	receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ
PPAR δ	receptor activado por proliferadores de peroxisomas δ
PPER	elemento de respuesta para PPAR

PTOG	prueba de tolerancia oral a la glucosa
RER	coeficiente de intercambio respiratorio
S.E.M.	error estándar
SCD1	estearoil-coenzima A desaturasa 1
SDH	serina deshidratasa
SREBP1	proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides 1
TBQH	terbutil hidroquinona
VC	valor calorífico
VCO ₂	volumen de dióxido de carbono liberado
VO ₂	volumen de oxígeno consumido
WT	ratones silvestres "wild type"
β ₂ MG	β ₂ -microglobulina

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Ácidos grasos.....	2
Ácidos grasos y la regulación de la expresión génica	3
Función biológica de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)	4
Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α).....	8
Regulación transcripcional por PPAR α	9
Ligandos de PPAR α	11
Justificación	12
Hipótesis	13
Objetivos	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Metodología	14
Animales	14
Dietas	15
Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios	17
Determinaciones bioquímicas séricas	17
Prueba de tolerancia a la glucosa	18
Gasto energético	18
Extracción de RNA.....	18
Cuantificación relativa por PCR en tiempo real	18
Análisis estadístico.....	19
Resultados	21
Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios	24
Peso y composición corporal	25
Alteraciones en el metabolismo de la glucosa	28
Captación de la glucosa	30
Gasto energético y modificación del uso de sustratos	33
Análisis de la oxidación de carbohidratos y lípidos	37
Parámetros lipídicos y lipoproteícos en plasma	41
Vías metabólicas reguladas por el PPAR α , el tipo y la cantidad de ácidos grasos	43
<i>Oxidación de ácidos grasos</i>	43
<i>Síntesis de ácidos grasos</i>	46
<i>Degradación de aminoácidos</i>	48

Discusión	52
Conclusiones.....	60
Perspectivas	61
Bibliografía	62

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la transcripción génica dependiente de PPAR α	10
Figura 2. Genotipificación por PCR del gen PPAR α	22
Figura 3. Efecto del postprandio sobre las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL.....	23
Figura 4. Diseño del estudio para evaluar el efecto de la cantidad y tipo de ácido graso mediado por el PPAR α en el metabolismo de lípidos y oxidación de amino ácidos en hígado.....	24
Figura 5. Determinaciones del peso corporal, ganancia final de peso corporal e ingesta media diaria de energía por individuo normalizada por el peso corporal.....	27
Figura 6. Determinaciones del porcentaje de peso corporal del tejido adiposo epididimal, perirenal e hígado.....	28
Figura 7. Determinaciones en suero de los niveles séricos de insulina, glucagon y glucosa.....	30
Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones	32
Figura 9. Niveles del consumo de oxígeno (VO $_2$) en el postprandio y ayuno.....	35
Figura 10. Niveles del RER en el postprandio y ayuno.....	36
Figura 11. Niveles del gasto energético en el periodo postprandial y ayuno.....	38
Figura 12. Porcentaje del valor promedio del gasto calórico proporcionado por carbohidratos y lípidos para cada uno de los tratamientos dietarios.....	40
Figura 13. Determinaciones en suero de los niveles de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos.....	42
Figura 14. Niveles relativos de mRNA de los genes PPAR α , PGC1 α , ACOX1, CPT1 α y PPAR δ normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina.....	45

Figura 15. Niveles relativos de mRNA de los genes SREBP1, PPAR γ , SCD1, ACC, FAS normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina	47
Figura 16. Niveles relativos de mRNA de los genes HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina	49
Figura 17. Mapa de color de los niveles relativos de mRNA de los genes involucrados en oxidación y síntesis de ácidos grasos y degradación de aminoácidos normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina	51
Figura 18. Adaptaciones metabólicas ocurridas en los ratones WT y KO PPAR α	63

Índice de tablas

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes en los sistemas biológicos.....	3
Tabla 2. Composición de las dietas utilizadas en el estudio de acuerdo a la AIN-93....	16
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el estudio.....	20
Tabla 4. Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios.....	25
Tabla 5. Oxidación de mezclas de carbohidratos y lípidos.....	39

Resumen

El PPAR α es un factor de transcripción que une ácidos grasos provenientes de la dieta, y al modular el uso de los sustratos energéticos, desempeña importantes funciones en la regulación de la homeostasis metabólica. Considerando que el PPAR α es un sensor molecular de ácidos grasos, en este trabajo se evaluó el efecto del aceite de soya (70% de ácidos grasos poliinsaturados), aceite oleico (71% de ácidos grasos monoinsaturados) y aceite de coco (88% de ácidos grasos saturados) en dos concentraciones (7% y 21%) como posibles moduladores en la expresión génica del metabolismo de lípidos y catabolismo de aminoácidos en la ausencia y la presencia de PPAR α . Después de tres meses del consumo de los aceites se concluye que el consumo de aceite oleico en ratones WT y KO PPAR α estimula en mayor grado la oxidación de ácidos grasos y mantiene niveles bajos de expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos (EDAA). El consumo de aceite de soya reduce la expresión de genes involucrados en lipogénesis en hígado y reprime el catabolismo de aminoácidos, pero por mecanismos poco claros, el consumo de aceite de soya al 21% promueve la ganancia de peso y aumento del tejido adiposo aunque con mejoras en los niveles de LDL. El consumo de aceite de coco promueve alteraciones en el perfil de lípidos en el suero y una desregulación en el metabolismo hepático de lípidos, con un patrón no muy claro en el catabolismo de aminoácidos. En ausencia de PPAR α se propone que PPAR δ pudiera estar ocupando el lugar de PPAR α en la regulación del catabolismo de ácidos grasos. Los ratones KO PPAR α muestran alteraciones en el perfil de lípidos en suero. Tanto en ratones WT y KO PPAR α , el alto consumo de grasa dietaria disminuye la lipogénesis hepática. La ausencia de PPAR α aumenta la concentración de glucagon y estimula el catabolismo de aminoácidos, excepto en los ratones alimentados con aceite oleico ya que éste eleva la concentración de glucosa en sangre e inhibe el aumento en la expresión de EDAA. El fenotipo de los ratones KO PPAR α no se asocia con un fenotipo obeso. Por último, nuestros resultados demuestran la importancia de PPAR α como un interruptor metabólico que modula el uso de sustratos energéticos y la influencia de los ácidos grasos como ligandos y reguladores de PPAR α .

Introducción

El organismo de los mamíferos requiere alrededor de 50 nutrimentos que son indispensables para su correcto funcionamiento y desarrollo, dentro de los cuales se encuentran las vitaminas, los minerales, los amino ácidos, los carbohidratos y los lípidos (Jeffer 1969). Los lípidos forman parte de los tejidos de plantas y animales y son clasificados como: esteroides, fosfolípidos, esfingomielinas, ceras y grasas. Los principales componentes de todas las grasas son los ácidos grasos, que pueden ser saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) o poliinsaturados (AGP). Las grasas saturadas contienen una gran proporción de ácidos grasos saturados, son sólidas a temperatura ambiente y generalmente son de origen animal como la manteca, el sebo y la mantequilla. Por otro lado, las grasas insaturadas, en su mayoría de origen vegetal, son ricas en ácidos grasos poliinsaturados o monoinsaturados y son líquidas a temperatura ambiente (Rodríguez-Cruz et al. 2005). Actualmente se sabe que algunos ácidos grasos pueden actuar como reguladores metabólicos ya que pueden unirse a una gran variedad de factores de transcripción; lo anterior resalta la importancia de los ácidos grasos como moléculas señalizadoras y no sólo como moléculas que aportan energía (Chow 2007).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22, ya que su síntesis biológica tiene lugar mediante la adición sucesiva de unidades de acetil CoA en su forma de malonil CoA. Sin embargo, también existen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par. En las plantas y animales superiores, los ácidos grasos predominantes son los que contienen 16 y 18 átomos de carbono, por ejemplo: el ácido palmítico, oleico, linoleico y esteárico. Los ácidos grasos con <14 o >20 átomos de carbono no son comunes. Los ácidos grasos son los constituyentes principales de los fosfolípidos, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres de colesterol. Los ácidos grasos pueden ser saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (un doble enlace) o poliinsaturados (dos o más dobles enlaces) (Rodríguez-Cruz et al. 2005). Así

mismo, los ácidos grasos son moléculas biológicas ubicuas que son utilizadas como sustratos energéticos, reguladores covalentes de moléculas señalizadoras y son componentes esenciales de las membranas celulares. Los tipos más comunes de ácidos grasos biológicos se enumeran en la Tabla 1 (Dawson et al. 1986).

Tabla 1. Ácidos grasos más comunes en los sistemas biológicos

Símbolo ^a	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura	mp(°C)
Ácidos grasos saturados				
12:0	Ácido láurico	Ácido dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	44.2
14:0	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	52.0
16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	63.1
18:0	Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	69.6
20:0	Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	75.4
22:0	Ácido behénico	Ácido docosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	81.0
24:0	Ácido lignocérico	Ácido tetracosanoico	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	84.2
Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)				
16:1 _{n-7}	Ácido palmitoleico	Ácido 9-Hexadecenoico	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	-0.5
18:1 _{n-9}	Ácido oleico	Ácido 9-Octadecenoico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	13.4
18:2 _{n-6}	Ácido linoleico	Ácido 9,12-Octadecadienoico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH	-9.0
18:3 _{n-3}	Ácido α-linolénico	Ácido 9,12,15-Octadecatrienoico	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH	-17.0
18:3 _{n-6}	Ácido γ-linolénico	Ácido 6,9,12-Octadecatrienoico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₃ COOH	
20:4 _{n-4}	Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH	-49.5
20:5 _{n-4}	EPA	Ácido 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₅ (CH ₂) ₂ COOH	-54.0
22:6 _{n-4}	DHA	Ácido 4,7,10,13,16,19-Docosahexenoico	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₆ CH ₂ COOH	
24:1 _{n-4}	Ácido nervónico	Ácido 15-Tetracosenoico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₃ COOH	39.0

^aNúmero de átomos de carbono: número de dobles enlaces. Para los ácidos grasos insaturados, *n* es el número de átomos de carbono, *n* - *x* es el átomo de carbono con el doble enlace y *X* es el número del átomo de carbono del metilo terminal (*ω*) de la cadena.

Ácidos grasos y la regulación de la expresión génica

Actualmente se sabe que los ácidos grasos no sólo son importantes fuentes de energía, si no también importantes moduladores de las vías de señalización intracelular y del metabolismo (Jump and Clarke 1999; Clarke et al. 2002). Los efectos de los ácidos grasos dietarios sobre la expresión génica son reflejo de una respuesta adaptativa a los cambios en la cantidad y el tipo de grasa ingerida, cambios sentidos por factores de transcripción. Entre estos factores se incluyen a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARα, -β y -γ), HNF4α, NFκB, y SREBP1. Estos factores de transcripción se regulan por: la unión directa de los ácidos grasos o en su forma unida con coenzima A. La activación de los receptores de la superficie celular mediada por ácidos grasos y las subsecuentes cascadas de

señalización y los niveles de calcio intracelular regulados por ácidos grasos también afectan las cascadas de señalización dirigidas a modificar la expresión génica en el núcleo. Es por esto que, los ácidos grasos dietarios tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica particularmente en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Cabe señalar que el tipo de respuesta dependerá de las interacciones específicas entre los ácidos grasos y los factores de transcripción (Jump and Clarke 1999; Rodríguez-Cruz et al. 2005). Por ejemplo, actualmente se conoce la capacidad reguladora que tienen los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) en la expresión de genes en diferentes órganos como tejido adiposo, páncreas, el sistema inmune y principalmente en el hígado (Sanders 2013; Rodríguez-Cruz et al. 2005; Forman, Chen, and Evans 1997; Sampath and Ntambi 2005). Entre los factores de transcripción más importantes involucrados en el control metabólico se encuentra la superfamilia de los receptores activado por los proliferadores de peroxisomas (PPARs). El PPAR α pertenece a esta superfamilia y desempeña un papel esencial en el control de la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos (Jump and Clarke 1999) y de aminoácidos (Contreras, Rangel, Torres, Alemán, Ortiz, Noriega, Torre, et al. 2015; S Kersten et al. 2001a).

Función biológica de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (por sus siglas en inglés, proliferator peroxisome activator receptor, PPARs) regulan muchos aspectos del metabolismo energético a nivel transcripcional en diferentes tejidos (hígado, músculo y tejido adiposo). La subfamilia de los receptores nucleares PPAR, consta de tres miembros, PPAR α , PPAR δ (también conocido como PPAR β o β/δ) y PPAR γ .

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que están involucrados principalmente en la regulación de la homeostasis de lípidos, son activados por ligandos y controlan la expresión de genes principalmente a través de su unión a elementos de respuesta en el ADN que son denominados elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE) localizados en regiones promotoras de ciertos genes blanco. Estos receptores regulan diferentes procesos metabólicos y

por esto se han convertido en uno de los grupos de receptores más intensamente estudiados (S Kersten, Desvergne, and Wahli 2000; Desvergne 1995). Los PPAR forman heterodímeros con el receptor del ácido 9-*cis*-retinoico (RXR) para unirse a sitios específicos en el ADN, y reclutan una variedad de cofactores tales como CBP/p300 y SRC-1 (J. Berger and Moller 2002). Cada uno de los tres isotipos principales de PPAR (α , β/δ , y γ) tienen características particulares en cuanto a su distribución, selectividad por el ligando y función. La superfamilia de los receptores nucleares está dividida en 6 subfamilias, y los PPAR pertenecen a la subfamilia 1 que además incluye otros 10 grupos de receptores (TR, RAR, PPAR, REV-ERB, E78, RZR/ROR, CNR14, ECR, VDR, DHR96 y NHR1) (Laudet et al. 1999).

Los tres isotipos de la familia de los PPAR tienen dominios proteicos de unión a ADN (DBD) y de unión a ligando (LBD). El LBD consiste de 12 α -hélices que delimitan el sitio de unión a ligando, una cavidad hidrofóbica en forma de Y relativamente más grande que en otros receptores (Gampe et al. 2000). Esta característica puede explicar la capacidad de los PPAR de unirse a un amplio rango de compuestos lipofílicos naturales y sintéticos con un grupo carboxilo. La cavidad de unión a ligando del PPAR β/δ es de menor tamaño en comparación con las reportadas para el PPAR α y PPAR γ , lo que puede indicar que el tamaño de las cavidades contribuye a la especificidad del ligando de cada isotipo (Horváth et al. 2016), conviene mencionar que la selectividad por el ligando varían incluso por diferencias de un solo aminoácido.

Los PPAR forman heterodímeros con los RXR y la activación de los PPAR por la unión del ligando estabiliza el LBD en una estructura relativamente rígida y compacta en la que la hélice 12 está en una conformación que promueve la unión de proteínas coactivadoras o la liberación de correpresores y tiene una función crítica en la estimulación de genes blanco (Nagy and Schwabe 2004). El heterodímero PPAR/RXR se une al PPRE de los genes blanco y posteriormente se requiere del remodelamiento de los nucleosomas por desacetilación de histonas y reposicionamiento para permitir la formación del complejo de iniciación de la transcripción.

El PPAR α es el primer integrante del grupo C de la superfamilia 1 de receptores nucleares (NR1C1), fue el primero en describirse como un receptor que es activado por

proliferadores de peroxisomas (Desvergne and Wahli 1999). Posteriormente, fueron encontrados y caracterizados dos isotipos relacionados: el PPAR β/δ (NR1C2) y el PPAR γ (NR1C3) (Dreyer et al. 1992). Cada uno de los isotipos de los PPAR es codificado en un gen independiente y se le han atribuido diversas funciones celulares y sistémicas, no obstante se caracterizaron por su fuerte capacidad de estimular la proliferación de peroxisomas en roedores razón por la cual adquirieron su nombre. En relación a sus funciones fisiológicas y de desarrollo, la expresión de los PPAR es específica de tejidos e isotipos (Braissant et al. 1996). Por ejemplo, el PPAR α se expresa principalmente en órganos que llevan a cabo un mayor número de reacciones catabólicas como son el tejido adiposo pardo, hígado, corazón, riñón e intestino (Mandard, Müller, and Kersten 2004). De los tres isotipos, el PPAR β/δ tiene el patrón de expresión mas ubicuo, por lo que los niveles de expresión en ciertos tejidos dependen del estado de proliferación y diferenciación celular. Funciones importantes se han asociado a este isotipo en la piel, placenta, intestino, músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro (Braissant et al. 1996). El PPAR γ se expresa como dos isotipos $\gamma 1$ y $\gamma 2$ que difieren en sus extremos amino terminal. Altas concentraciones del PPAR $\gamma 2$ se encuentran en el tejido adiposo (Chawla and Lazar 2014), mientras que el PPAR $\gamma 1$ tiene un patrón de expresión más amplio, el cual se extiende a tejidos como el intestino, cerebro, células vasculares, inflamatorias e inmunes (Zhu et al. 1995).

El papel más importante del PPAR α es la regulación de la homeostasis energética, acorde con su distribución en tejidos con altas tasas catabólicas de ácidos grasos y alta actividad peroxisomal (Lefebvre et al. 2006). Especialmente en hígado, el PPAR α activa el catabolismo de los ácidos grasos, estimula la gluconeogénesis, la síntesis de cuerpos cetónicos y está involucrado en el control del ensamblaje de proteínas (Sander Kersten et al. 1999). El PPAR α también estimula la síntesis del grupo hemo y el catabolismo del colesterol. Además, atenúa las respuestas inflamatorias y participa en el control del metabolismo de aminoácidos y síntesis de urea (Staels et al. 1998; S Kersten et al. 2001a). El incremento de la oxidación de ácidos grasos mediado por el PPAR α disminuye la concentración circulante de triglicéridos, la esteatosis en hígado y músculo, reduciendo la adiposidad lo cual mejora la sensibilidad a la insulina (H. Kim et al. 2003). Los fármacos del grupo de los fibratos, tales como el gemfibrozil, clofibrato y

fenofibrato son activadores del PPAR α y que son empleados para tratar la hipertrigliceridemia. De igual modo se ha reportado que los agonistas del PPAR α tienen actividad anti-inflamatoria que promueven acciones protectoras dentro de sistema cardiovascular (J. P. Berger, Akiyama, and Meinke 2005).

El PPAR β/δ es necesario para el desarrollo del intestino y la placenta, también está involucrado en el control de la homeostasis energética por medio de la estimulación de genes relacionados con el catabolismo de ácidos grasos y termogénesis adaptativa (Varnat et al. 2006; Nadra et al. 2006). Además, juega un papel importante en el control de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia, y participa en la reparación de tejidos (L. Michalik and Wahli 2006). En modelos animales, los agonistas del PPAR β/δ retardan el incremento de peso durante el consumo de una dieta alta en grasa y mantiene la sensibilidad a la insulina, probablemente a través de la estimulación de la termogénesis así como del metabolismo de ácidos grasos en músculo esquelético (Wang et al. 2003).

El PPAR γ es importante en la diferenciación del tejido adiposo y el mantenimiento de las funciones específicas del adipocito, tales como almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo blanco y la disipación de energía en el tejido adiposo pardo. Además, se requiere para la supervivencia de adipocitos diferenciados (Imai et al. 2004; Koutnikova et al. 2003). El PPAR γ participa en el metabolismo de la glucosa ya que mejora la sensibilidad a la insulina (Savage et al. 2003). Entre los compuestos sintéticos que selectivamente activan al PPAR γ se encuentran las tiazolidinedionas, que son compuestos sensibilizadores a la insulina usados para tratar la hiperglicemia en la diabetes tipo 2. El uso clínico de estos agonistas así como el descubrimiento de mutaciones dominantes negativas deletéreas raras, que conllevan a un síndrome de lipodistrofia parcial y resistencia severa a la insulina, han permitido el conocimiento y entendimiento de las funciones de este isotipo en humanos (Semple, Chatterjee, and Rahilly 2006).

Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α)

El PPAR α se expresa principalmente en hígado, corazón, riñón y grasa parda. En estos tejidos modula la transcripción de genes relacionados con diversos procesos biológicos, principalmente con el metabolismo de lípidos, la homeostasis de la glucosa, la inflamación y el proceso hepatocarcinogénico (Braissant et al. 1996; Mandard, Müller, and Kersten 2004). El PPAR α tiene un dominio funcional de unión al ADN (DBD) y de unión a ligando (LBD). El DBD está flanqueado por una región N-terminal conocida como dominio de activación independiente a ligando (AF-1) que es activado por fosforilación. El DBD le confiere al PPAR α la capacidad de unirse al PPRE en el promotor de genes blanco. La secuencia consenso de ADN de los PPRE es AGGTCANAGGTCA, donde N puede ser cualquier nucleótido y está flanqueada río arriba por secuencias ricas en A y T. El extremo C-terminal contiene el dominio de unión al ligando conocido como dominio E regulado por ligando (AF-2) o LBD, una cavidad con un volumen de aproximadamente 1300 Å³ (Lefebvre et al. 2006; Cronet et al. 2001). Estudios de cristalografía indican que la unión del ligando al PPAR α induce una estabilización global de la conformación del receptor, que facilita las interacciones proteína-proteína con coactivadores o correpresores, quienes pueden estimular la remodelación de la cromatina por acetilación, desacetilación, metilación y desmetilación de la misma, para el ensamblaje del complejo de preiniciación en los promotores. La respuesta transcripcional está fuertemente influida por la estructura química del ligando y la naturaleza del PPRE (Duez et al. 2005).

Por otra parte, la activación del PPAR α es regulada por fosforilación. El tratamiento con insulina incrementa la fosforilación del PPAR α y casi duplica su actividad transcripcional en células HepG2 en cultivo. Esta fosforilación mediada por insulina involucra los aminoácidos Ser12 y Ser21 (Juge-Aubry et al. 1999). Los estímulos por estrés ejercen un incremento en la fosforilación del PPAR α en miocitos cardiacos neonatales de rata por la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno-p38 (MAPK) (Barger et al. 2001). La MAPK p38 fosforila los residuos de Ser 6, 12 y 21 localizados en el dominio A/B -N terminal de la proteína, lo que mejora significativamente la transactivación dependiente de ligando del PPAR α . Por otro lado, también se ha descrito que el PPAR α es fosforilado por la proteína cinasa C (PKC). La inhibición de la

actividad de PKC afecta la actividad del PPAR α dependiente de ligando. Además, la proteína del PPAR α purificada es fosforilada *in vitro* por las proteínas recombinantes de PKC α y β II. Así, la ruta de señalización de PKC puede actuar como un interruptor molecular para las propiedades de transactivación y transrepresión del PPAR α , lo cual involucra la fosforilación de Ser179 y Ser230 (Blanquart et al. 2004).

Regulación transcripcional por PPAR α

El PPAR α es activado por ligandos como los ácidos grasos poliinsaturados y fármacos como los fibratos y cuando se encuentra en su forma activa se une a los elementos de respuesta para PPAR (PPER) en los genes blanco. Para realizar su actividad transcripcional el PPAR α se heterodimeriza con el receptor X del ácido retinoico (RXR; NR2B) (Kliwer et al. 1992) y al ser activado por un ligando como el ácido graso 1-palmitoil 2-oleil fosfatidilcolina (16:00/18:01 PC) modula la regulación transcripcional a través de la unión al PPRE (Dreyer et al. 1992). El PPRE está usualmente presente en una o múltiples copias en la región promotora de los genes blanco y también puede estar localizado en la región proximal de ciertos genes que responden a la activación de PPAR α (Di-Po et al. 2002). El heterodímero formado por el PPAR α y el RXR se unen a los sitios 5' y 3' de los PPRE, respectivamente. Se ha observado que la región que flanquea en el extremo 5' influye en la unión selectiva entre los diferentes isotipos de los PPAR (Juge-aubry et al. 1997).

El control transcripcional del heterodímero PPAR α /RXR requiere la interacción con complejos correguladores, tanto coactivadores para la estimulación o correpresores para la inhibición de la expresión de genes blanco (Stanley et al. 2003). Los PPAR como otros receptores nucleares interactúan con coactivadores tales como SRC-1 (coactivador 1 del receptor esteroideo) o correpresores como N-CoR (correpresor nuclear) y SMRT (mediador de silenciamiento para los receptores retinoide y de la hormona tiroidea). Además, el PPAR α puede interactuar con proteínas CBP/300 miembros de la familia SRC/p160, PBP/MED1, PRIP/NCoA6, PRIC285, PRIC295, PRIC320, PGC1 α y PGC1 β , así como a proteínas asociadas a coactivadores, tales como PIMT (NCoA6IP) y CARM-1 (Yu and Reddy 2007).

Adicionalmente, fue aislado de extractos nucleares de hígado de rata un complejo corregulador de interacción con el PPAR α , constituido por coactivadores conocidos como CBP, SRC1, PBP, PRIP, PIMT, TRAP100, SUR2, PGC1 y algunas otras proteínas designadas como PRIC300, -285, -177 y -145. Por consiguiente, se demuestra que la presencia de muchos de estos correguladores forman un mega complejo que participa en la transcripción de genes blanco de PPAR α (Surapureddi et al. 2002). Es importante recalcar que la acción selectiva de uno de los tres isotipos de PPAR *in vivo* es resultado de una compleja interrelación entre el nivel de expresión de cada uno de ellos y RXR, la afinidad por un PPRE específico en el promotor, la disponibilidad del ligando, los cofactores y la posibilidad de la unión de otro factor de transcripción en la vecindad del PPRE, todo esto en una condición específica (Liliane Michalik et al. 2006).

De esta manera el factor PPAR α puede regular a enzimas involucradas en la beta oxidación tales como la acil coenzima A oxidasa (ACOX), acil-CoA deshidrogenasa (AOX) y la carnitin palmitoil transferasa 1 (CPT-1). Así por ejemplo, en modelos murinos se ha demostrado que a través de PPAR α los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) pueden regular específicamente la expresión a la baja de genes lipogénicos, (Desvergne and Wahli 1999; Contreras, Torres, and Tovar 2013) (Figura 1).

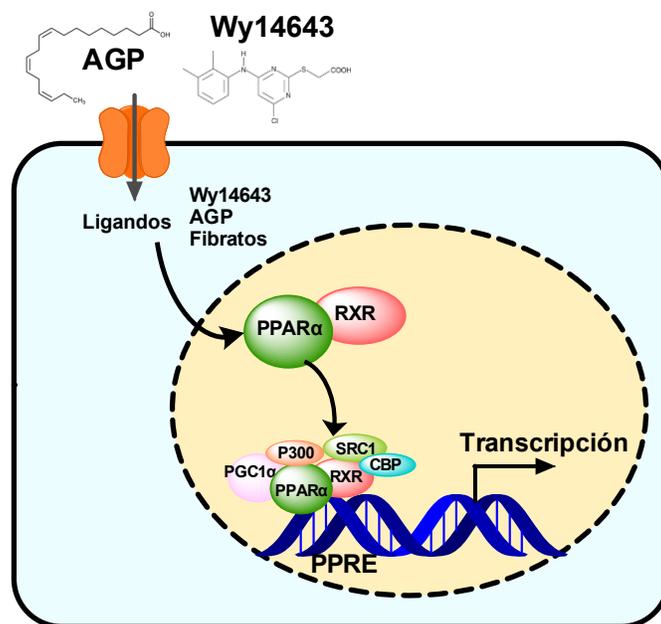


Figura 1. Representación esquemática de la transcripción génica dependiente de PPAR α , la cual depende de la unión con el ligando y el reclutamiento de moléculas coactivadoras. Entre los ligandos que pueden activar a PPAR α pueden ser los AGP (16:0/18:01 PC) y los fibratos.

Ligandos de PPAR α

Los ligandos de PPAR α son clasificados por su carácter sintético o natural. Los ligandos sintéticos también conocidos como proliferadores de peroxisomas, incluyen a los fibratos. Los fibratos son fármacos hipolipemiantes, entre los que se encuentran el clio fibrato, el fenofibrato, el gemfibozil, el bezafibrato, el ciprofibrato, el nafenopin, el metil clofenapato y el Wy 14643. Estos compuestos químicos poseen estructuras diversas que inducen respuestas similares y reproducibles en hígado de ratón y rata, promoviendo la proliferación de peroxisomas en células parenquimales de hígado, así como la activación transcripcional de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (Maloney and Waxman 1999).

Los ligandos naturales del PPAR α incluyen ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga y sus derivados, como las prostaglandinas D1 y D2 así como los ácidos grasos ramificados pristánicos y fitánicos. Los ácidos grasos monocarboxílicos de cadena larga (16-20 carbonos) con varios dobles enlaces son los ligandos que han mostrado una óptima actividad de unión (Forman, Chen, and Evans 1997). Además, los ligandos naturales pueden ser generados durante el catabolismo de ácidos grasos y la síntesis de nuevos lípidos *in vivo* tal como la 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (16:0/18:1-GPC) un ligando endógeno que induce la expresión génica dependiente del PPAR α y disminuye la esteatosis hepática (Chakravarthy et al. 2009).

Actualmente existe evidencia que muestra que los ácidos grasos, particularmente los ácidos grasos insaturados ejercen muchos de sus efectos a través de modular la transcripción génica regulando la actividad de PPAR α (Afman and Müller 2012). Así, por ejemplo se ha demostrado que los ácidos grasos EPA, DHA y el ácido linoleico conjugado son potentes activadores de PPAR α (Krey et al. 1997). El fitol, un componente de la clorofila, también se ha identificado como un activador específico del PPAR α (Goto et al. 2005). El leucotrieno B4 es otro ligando conocido del PPAR α que conecta a este receptor nuclear con las respuestas inflamatorias e inmunes (Narala et al. 2010).

Justificación

Los nutrimentos pueden de manera directa o indirecta regular la vía de expresión de genes que codifica a proteínas involucradas en rutas metabólicas relacionadas con el uso de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. En particular, los ácidos grasos actúan como ligandos de PPAR α para inducir la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico en hígado (Georgiadi and Kersten 2012; Mandard, Müller, and Kersten 2004) y la regulación de los carbohidratos (Baes and Peeters 2010).

Además, se ha reportado que el PPAR α no sólo regula el metabolismo de la glucosa y de lípidos sino también el metabolismo de aminoácidos. En un estudio por Kersten *et al.* 2001 se estudió mediante análisis de microarreglos la expresión de genes en el hígado que son regulados por PPAR α y se reportó que PPAR α modula la expresión de genes involucrados en la trans y desaminación de los aminoácidos y de la síntesis de urea (S Kersten *et al.* 2001b).

En un estudio más reciente por Alemán *et al.* 2013 se reportó que ligandos sintéticos y naturales de PPAR α regulan la expresión hepática de EDAA. De estos estudios se infiere entonces la importancia del PPAR α en la retención del nitrógeno corporal ya que se propone que puede estar regulando negativamente la oxidación de aminoácidos (Alemán *et al.* 2013a). Posteriormente, en nuestro grupo de trabajo se encontró que la expresión de EDAA es regulada por la atenuación en la actividad transcripcional de HNF4 α inducida por el factor PPAR α , resultados que se corroboraron por ensayos de retardo electroforético (EMSA) y ensayos de gen reportero en el promotor del gen que codifica a la SDH (Contreras, Rangel, Torres, Alemán, Ortiz, Noriega, Torre, *et al.* 2015); resultados que señalan que PPAR α junto con HNF4 α regulan a la baja la expresión de genes en el catabolismo de amino ácidos para evitar la pérdida de nitrógeno corporal. De esta manera, se infiere la importancia del PPAR α en la regulación de la homeostasis energética y en la utilización de sustratos energéticos, es decir en el cambio de emplear ácidos grasos y aminoácidos como fuentes energéticas. Por otra parte, aún no se tienen reportes que estudien cómo los factores ambientales y/o nutricionales afectan la respuesta del PPAR α en el catabolismo de aminoácidos y el metabolismo de ácidos grasos.

Por lo anterior, en el presente estudio se planteó evaluar la participación del tipo y la cantidad de los ácidos grasos dietarios como ligandos de PPAR α sobre el catabolismo de aminoácidos y el metabolismo de ácidos grasos en la ausencia y presencia del factor de transcripción PPAR α .

Hipótesis

La cantidad y tipo de ácidos grasos dietarios modularán la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos dependientes de PPAR α .

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la expresión de genes involucrados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos por la cantidad y tipo de ácidos grasos en la dieta, en la presencia o ausencia del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α).

Objetivos específicos

Determinar cambios causados por la cantidad y tipo de aceites dietarios por la presencia o ausencia de PPAR α en:

- Consumo de alimento y la ganancia de peso corporal.
- Perfil bioquímico en suero (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, LDL, insulina y glucagon).
- Gasto energético.
- Cambios en la expresión en hígado de las proteínas involucradas en:
 - ▶ Oxidación de aminoácidos (factor nuclear 4 alfa de hepatocito, HNF4 α ; histidasa, HAL; serina deshidratasa, SDH y glutaminasa).
 - ▶ Síntesis de ácidos grasos (proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides 1, SREBP1; receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma, PPAR γ ; SCD1, esteroil-coenzima A desaturasa 1; ACC, acetil-coenzima A carboxilasa; y ácido graso sintasa, FAS).
 - ▶ Oxidación de ácidos grasos (receptor activado por los proliferadores de

peroxisomas alfa, PPAR α ; receptor activado por los proliferadores de peroxisomas delta, PPAR δ ; coactivador del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma 1 alfa PGC1 α ; acil-CoA oxidasa, ACOX1; y carnitina palmitoiltransferasa 1, CPT1).

Metodología

Animales

Ratones macho de fondo genético C57BL/6 (WT) y knock-out de PPAR α (KO PPAR α) de entre 7-9 semanas de edad con un peso promedio de 22.4 ± 0.5 g se alimentaron con una de las dietas experimentales (Tabla 2). Los ratones KO PPAR α producen una forma mutada del mRNA de PPAR α que impide la expresión de la proteína PPAR α funcional, en consecuencia los ratones KO PPAR α presentan alteraciones en el almacenamiento y procesamiento de lípidos (Aoyama et al. 1998; Akiyama et al. 2001). Los ratones KO PPAR α de los que se deriva la línea utilizada en el estudio, fueron desarrollados por el Dr. Frank González y sus colegas en el Laboratorio de Metabolismo, NCI, NIH (Lee et al. 1995). Para el modelo de la interrupción del gen PPAR α se utilizó un vector que contenía el exón 8 del gen PPAR α del que se eliminó y reemplazó 83 pares de bases con un cassette de resistencia a la neomicina. El vector se introdujo en células J1 ES derivadas de la cepa 129S4 por electroporación. Las células blanco de una clona fueron inyectadas en blastocistos C57BL/6 a la edad de 3-5 días y se implantaron en ratonas pseudo-preñadas. Se generaron cinco quimeras 129S4 x C57BL/6N, de las cuales tres machos se cruzaron con hembras C57BL/6. La descendencia heterocigótica se cruzó nuevamente para producir ratones homocigotos para el gen alterado. A partir de los ratones knock-out de PPAR α donados por el Dr. Frank González del Center for Cancer Research, National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) se generó una colonia en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán para realizar los experimentos que se describen en este trabajo. Sin embargo, debido a que el número de ratones por camada se encontraba entre uno a tres crías se realizaron nuevamente retrocruzas de ratones macho homocigotos KO PPAR α con ratones hembra C57BL/6. Los descendientes heterocigotos se aparearon para producir ratones homocigotos, que se volvieron a

cruzar por dos generaciones. Actualmente se mantienen las cruzas entre ratones homocigotos machos y hembras para producir descendencia homocigótica.

Para evaluar el efecto de la concentración y tipo de ácido graso en la dieta se utilizaron 36 ratones machos WT y 42 ratones KO PPAR α de entre 7-9 semanas de edad. Los ratones se alimentaron con una de las seis dietas isocalóricas durante un periodo de tres meses en un esquema de horario restringido de 9 horas de período postprandial (de 8 am a 5 pm), para sincronizar su consumo de alimento y evitar variabilidad hormonal y metabólica. Los ratones se mantuvieron en un ambiente constante a 22°C con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con acceso libre al agua.

Los ratones WT y KO PPAR α fueron divididos al azar en seis grupos experimentales (n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α , por grupo), los cuales fueron alimentados con la dieta control o una de las dietas experimentales. El peso corporal y la ingesta de alimento se registró cada dos días. Los ratones fueron sacrificados después de tres meses de consumir las dietas experimentales, se sometieron a eutanasia por anestesia profunda con isoflurano después de una hora de iniciar el periodo postprandial. La sangre fue colectada a través de la vena cava inferior con una aguja heparinizada y se obtuvo el suero por centrifugación a 1.000 g durante 10 min a 4°C y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se diseccionó inmediatamente el hígado, el tejido adiposo pardo, el epididimal y el retroperitoneal para ser pesados y lavados en solución salina al 0.9%. Se congeló el hígado en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El protocolo del manejo animal fue aprobado por la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México.

Dietas

Las dietas se formularon siguiendo las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (AIN-93) (Reeves et al. 1993). El Instituto Americano de Nutrición formó un comité ad hoc para determinar las normas dietéticas que deben seguir los estudios nutricionales con roedores. Así a partir de la necesidad de una formulación de dietas con las medidas nutricionalmente adecuadas surgió la dieta control formulada con

aceite de soya al 7% AIN-93 que es utilizada para estandarizar los estudios entre laboratorios, misma que se utilizó como dieta control en este estudio.

Se prepararon seis diferentes dietas con tres tipos de aceites, aceite de coco (91% AGS), aceite oleico (>80% AGM) y aceite de soya (63% AGP). Las dietas se prepararon con dos diferentes concentraciones de ácidos grasos, al 7% (15% de kcal, concentración adecuada para cubrir el requerimiento de grasa) y 21% (45% de kcal, dieta con tres veces el requerimiento de grasa). El contenido de grasa de las dietas se realizó modificando la cantidad de carbohidratos añadidos para mantener el mismo aporte calórico (Tabla 2).

Tabla 1. Composición de las dietas utilizadas en el estudio de acuerdo a la AIN-93

Ingredientes	Porcentaje (%) dietario de grasa/carbohidratos	
	g/Kg dieta	7/61
Caseína ^a	220	220
Sacarosa	100	100
Almidón de maíz	367	263
Dextrosa	132	96
Fuente de grasa ^b	70	210
Mezcla de Vitaminas ^d	10	10
Celulosa (fibra)	50	50
Mezcla de minerales ^c	50	50
Citrato de colina ^e	1.7	1.7
TBQH (antioxidante)	0.014	0.014

^a Caseína libre de vitaminas, dietas para investigación Harlan Teklad, Madison, WI. Concentración de aminoácidos (g/100 g de proteína): 2.8 Ala, Arg 3.4, Asp 6.3, Cys 0.3, Glu 20.5, Gly 1.6, His 2.5, 4.7 Ile, Leu 8.2, Lys 7.2, 1.9 Met, Phe 4.4, Pro 9.5, Ser 5.0, Thr 3.8, Trp 1.6, 4.7 Tyr y Val 6.0.

^b Fuentes de grasa:
 aceite de soya (Nutrioli, Industrias Ragasa, México)
 aceite de coco (Droguería Cosmopolita)
 aceite oléico (Droguería Cosmopolita)

^c Rogers-Harper, Harlan Teklad dieta investigación, Madison, WI.

^d AIN-93-VX, Harlan dietas investigación Teklad.

^e Dietas Harlan Teklad investigación.

Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios

Los ácidos grasos totales derivados de los lípidos de la dieta se midieron por homogeneización de 100 mg de muestra en 0.5 ml de 0.9% de NaCl y 1 ml de metanol. Posteriormente, los ácidos grasos se metilaron con 2 ml de metanol que contiene 0.002% hidroxitolueno butilado, 100 µl de tolueno y 40 µl de ácido sulfúrico disuelto en metanol (2%). Las muestras se incubaron a 90°C durante 2 h, se añadió 1 ml de NaCl al 5%, y luego los ácidos grasos metilados se extrajeron con 2 ml de hexano. La fase orgánica se evaporó bajo una corriente de nitrógeno hasta sequedad y el residuo de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se disolvieron en 200 µl de hexano para su análisis por cromatografía de gases (Agilent 6850 GC con detector de ionización de llama) utilizando una columna capilar HP-1 (30-m × 0.32-mm de diámetro interior con 0,25 mm de espesor de la película; J & W Scientific, Albany, Nueva York, EE.UU.). La inyección de 1 µl de solución de la muestra se llevó a cabo por duplicado en modo dividido (1: 20.8) a 225°C. Se utilizó helio como fase móvil, con un flujo constante de 0,5 ml/min, y la temperatura de la interfase se mantuvo a 225 ° C. La temperatura del horno se elevó de 180°C a 200°C (5 min a 180°C, aumentó a 190°C [1°C / min]; 5 min a 190°C, aumentó a 200°C [1°C / min]; 10 min a 200°C). La cuantificación de las muestras se llevó a cabo utilizando estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos y las áreas de los picos se obtuvieron de los cromatogramas generados como 100%.

Determinaciones bioquímicas séricas

En los ratones, la determinación en suero de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL y LDL, se realizó utilizando el analizador químico automatizado cobas c 111 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los niveles de glucagon sérico se midieron por radioinmunoensayo usando un kit de Millipore (Millipore, St. Charles, MO, USA) que utiliza glucagon marcado con ¹²⁵I y un anticuerpo anti-glucagon. La concentración de insulina se determinó usando un kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para insulina (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA). Los análisis se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante.

Prueba de tolerancia a la glucosa

Las pruebas de tolerancia a la glucosa se realizaron con una concentración de 2g de glucosa/Kg de peso corporal administrados intraperitonealmente. Los ratones se dejaron en ayuno de 12 horas durante la noche. Las muestras de sangre se obtuvieron de la punta de la cola a los tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos y los niveles de glucosa se midieron utilizando un glucómetro (FreeStyle, Abbott, CA, USA).

Gasto energético

El consumo de oxígeno (VO_2), la producción de dióxido de carbono (VCO_2), el gasto energético y el cociente de intercambio respiratorio (RER) se determinaron a través de calorimetría indirecta para cada ratón. Las mediciones se realizaron después de un periodo de aclimatación de un día en el equipo de circuito abierto y monitoreo metabólico Oxymax/Comprehensive Lab Animal Monitoring System (Oxymax Columbus Instruments, Ohio, USA). La relación entre el VCO_2 y el VO_2 (VCO_2/VO_2) determina el RER y brinda información del sustrato metabólico del cual se obtiene el aporte energético (carbohidratos, proteínas, grasa). Las mediciones se realizaron durante un periodo de seguimiento de un día para identificar las variaciones en los estados de ayuno y postprandio de los ratones.

Extracción de RNA

Se extrajo el RNA total de las muestras de hígado de los ratones utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La pastilla de RNA se resuspendió en 100 μ l de agua estéril y se evaluó su concentración y pureza a 260nm. Para evaluar la integridad del RNA se analizaron 15 μ g de RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 2.2 M de formaldehído.

Cuantificación relativa por PCR en tiempo real

La determinación de los niveles de expresión de mRNA de los genes involucrados en la síntesis (SREBP1, PPAR γ , FAS, ACC y SCD1) y oxidación de ácidos grasos (PPAR α , PPAR δ , PGC1 α , ACOX y CPT1 α) y degradación de aminoácidos (HNF4 α , Glutaminasa, SDH y HAL) se realizó por PCR-cuantitativo en tiempo real. A partir de 300 ng de RNA se sintetizó el cDNA utilizando la enzima transcriptasa inversa M-MLV y

oligo (dT) 12-18 cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para determinar los niveles de mRNA por PCR en tiempo real se realizaron ensayos fluorogénicos utilizando el reactivo LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La fluorescencia fue detectada en el equipo LightCycler® 480 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Operator's Manual Software Version 1.5). En los rangos dinámicos se utilizaron las siguientes concentraciones de cDNA: 60 ng, 12 ng, 2.4 ng, 0.48 ng y 0.096 ng, así como controles sin RNA.

El nivel de expresión para cada gen se determinó por triplicado usando 12 ng del cDNA y el par de oligos para cada gen (Sigma-Aldrich Co. LLC Life Science) en placas de 96 pozos ópticos LightCycler® 480 Multiwell Plates 96/384 clear (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), utilizando a m36B4 y β_2 -microglobulina como controles invariantes. La secuencia de los oligos sentido y antisentido que fueron utilizados se presentan en la Tabla 3.

El esquema de amplificación de PCR utilizado fue de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, y 45 ciclos de 94°C durante 15s seguido por 60°C durante 1 min. La expresión relativa se calculó en base a la eficiencia ($E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$) de los oligos y los valores del ciclo umbral (CT) de los grupos alimentados con aceite de soya 7% (control biológico) con respecto a los grupos alimentados con las diferentes dietas experimentales, y se expresó en comparación con los gen de referencia m36B4 y β_2 -microglobulina, basado en la siguiente ecuación (X se refiere al grupo de las diferentes dietas experimentales):

Expresión relativa

$$=(E \text{ gen de interés})^{\text{Ct1}(\text{Soya7\%-X})} / \sqrt{(E \text{ gen constitutivo1})^{\text{Ct2}(\text{Soya7\%-X})} (E \text{ gen constitutivo2})^{\text{Ct2}(\text{Soya7\%-X})}}$$

Análisis estadístico

Los valores se expresan como medias \pm error estándar (S.E.M.). Las diferencias entre los grupos experimentales fueron evaluados por análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido por una prueba de comparación múltiple Holm-Sidak, usando el software estadístico Prism 6.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, USA). En el

análisis de varianza de dos vías se evaluó la presencia o ausencia de PPAR α (Genotipo), el tipo de ácido graso en cada una de las concentraciones (Dieta) y la interacción entre los dos factores (Genotipo x Dieta). Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples señalan las medias que son significativamente diferentes entre sí, se indican en cada figura mediante letras diferentes entre los grupos (a>b>c>d), para todos los casos se considero al valor P<0.05 estadísticamente significativo.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el estudio

Gen	Oligo sentido	Oligo antisentido
m36B4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
β 2MG	TTCTGGTGCTTGTCTCACTG	TTATGTTGGCTTCCCATCT
PPAR α	CTCTGGGCAAGAGAATCCAC	CCTCTGCCTCTTTGTCTTCG
PPAR δ	CTCTTTCATCGCGCCATCCATTCT	TCTGCCATCTTCTGCAGCAGCTT
PGC1 α	AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT	GGTTATCTTGGTTGGCTTTATG
ACOX1	CCACATATGACCCCAAGACC	AGGCATGTAACCCGTAGCAC
CPT1 α	GCACTGCAGCTCGCACATTACAA	CTCAGACACTACCTCCTTCGGAA
SREBP1	AGACAAACTGCCCATCCACC	AAGCGGATGTAGTCGATGGC
PPAR γ	CGAGTCTGTGGGGATAAAGC	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG
FAS	CAAAGGACCAAGCATTGCCC	TACAACAGCCTCAGAGCGAC
ACC	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	GACTGTGCCTGGAACCTCTT
SCD1	TGCGATACACTCTGGTGCTC	TAGTCGAAGGGGAAGGTGTG
HNF4 α	AGAGGTTCTGTCCCAGCAGA	CAGAAGGAGTTCGCAGAAGG
Glutaminasa	CTTCTGCCAGAAGTTGGTGTCTCTC	CCGAGACATCTCCACTATATGCAGC
SDH	GACACTGGTGATCTTGGGCA	AAGAGCTGAAGGAGACGCTG
HAL	GGCCAAATAGTCCAGGGCTT	TCTGCGATCGTGTTCAGGAC

Resultados

En estudios previos se ha demostrado que el PPAR α puede regular la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y recientemente se ha reportado como un posible regulador de la homeostasis proteica ya que puede regular la expresión de genes involucrados en la degradación de aminoácidos. Por otra parte, se sabe que los ligandos de PPAR α son ácidos grasos o sus derivados. Por ello en este estudio se determinó la influencia del tipo y la cantidad de ácidos grasos en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos.

Para trabajar con el modelo KO PPAR α se verificó el genotipo de todos los ratones incluidos en el estudio, obtenidos de las retrocuzas. La genotipificación se realizó utilizando DNA genómico extraído de la cola de los ratones y digerida con 120 μ l de NaOH 100mM durante 1 hora a 95°C. Posteriormente se añadió 12 μ l de Tris-HCl 1M para neutralizar la solución básica y se utilizan 10 μ l para la reacción de PCR.

Secuencias de los oligos utilizados:

Oligo sentido 5'-3': GAGAAGTTGCAGGAGGGGATTGTG

Oligo antisentido 5'-3': CCCATTTTCGGTAGCAGGTAGTCTT

Oligo NEO 5'-3': GCAATCCATCTTGTTC AATGGC

El oligo NEO reconoce el segmento de DNA que se insertó en la transfección de las células durante la generación de los ratones KO PPAR α y produce un amplicón de aproximadamente 650 pb (Figura 2).

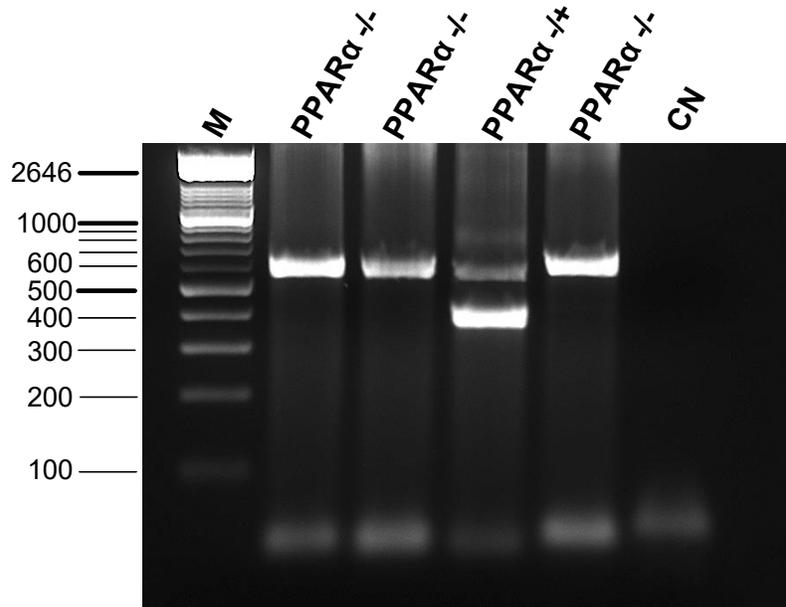


Figura 2. Genotipificación por PCR del gen PPAR α en ratones PPAR α ^{-/-} y PPAR α ^{+/-}. A partir de un fragmento de cola de los ratones (aproximadamente 0.5 cm) se extrajo el DNA genómico y se realizó la genotipificación por PCR utilizando los oligos sentido, antisentido (alelo WT~400 pb) y NEO (alelo KO PPAR α ~650 pb).

Los ratones WT y KO PPAR α se alimentaron con una de las seis diferentes dietas preparadas con aceite de soya, de coco u oleico a una de las dos concentraciones 7% o 21%. Debido a que en el postprandio se lleva a cabo la digestión de los alimentos y en particular la absorción de los ácidos grasos dietarios, se determinó evaluar este estado metabólico para las determinaciones bioquímicas en este trabajo.

Para establecer el tiempo de postprandio óptimo se realizó una curva temporal de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL en ratones WT. Se observó que a la hora después de iniciar el periodo postprandial no decaen los niveles de glucosa, colesterol, HDL y LDL. Además fue el tiempo en el que se alcanzó el pico más alto en el nivel de triglicéridos (Figura 3).

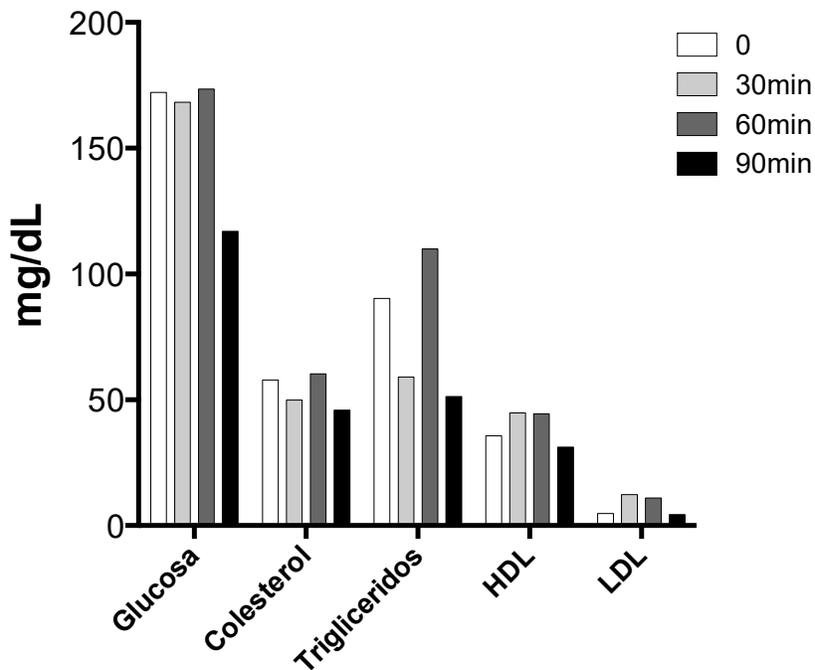


Figura 3. Efecto del postprandio sobre las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL. A partir del suero de ratones C57BL6 se midió la glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL al minuto 0, 30, 60 y 90 después de iniciado el postprandio.

Considerando estos resultados se determinó usar una hora de postprandio y para sincronizar su consumo de alimento y evitar variabilidad hormonal y metabólica, los ratones se alimentaron en un esquema de horario restringido de 9 horas de período postprandial (de 8 am a 5 pm). Además, con el propósito de evaluar el efecto a largo plazo en el fenotipo metabólico de los ratones WT y KO PPAR α alimentados con aceite de soya, de coco u oleico a una de las dos concentraciones 7% o 21%, el período de alimentación tuvo una duración de tres meses (Figura 4).

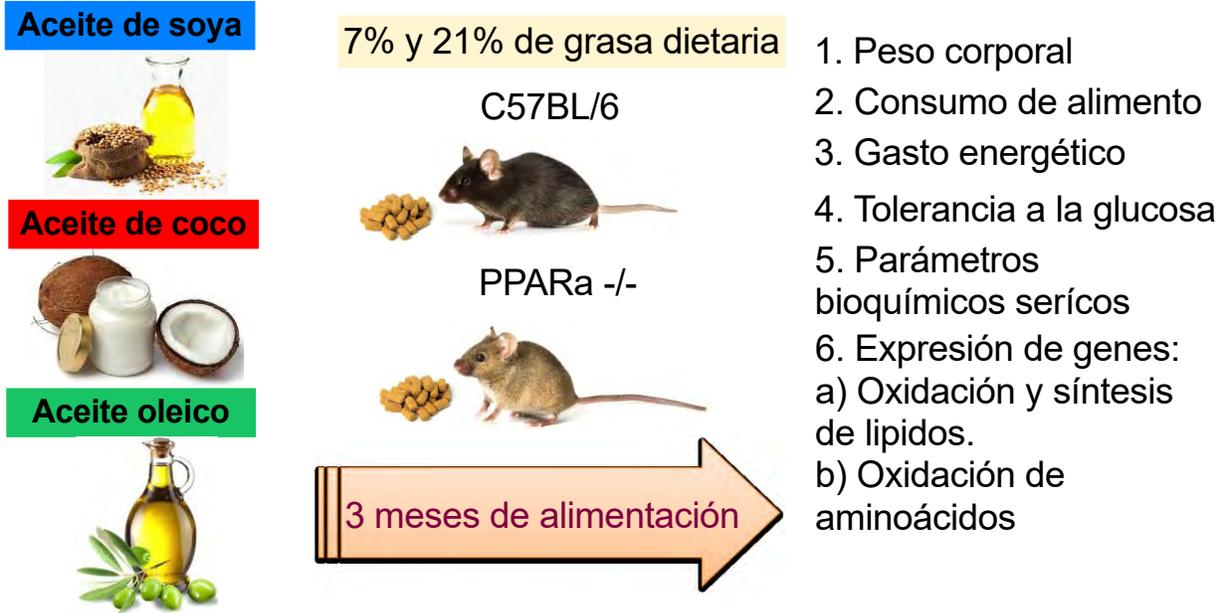


Figura 4. Diseño del estudio para evaluar el efecto de la cantidad y tipo de ácido graso mediado por el PPAR α en el metabolismo de lípidos y oxidación de aminoácidos en hígado. Los ratones WT y KO PPAR α se alimentaron con dietas con dos diferentes concentraciones de grasa dietaria 7% y 21% durante tres meses en un horario restringido con un periodo postprandial de 9 horas.

Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios

Para evaluar el efecto del tipo de aceite dietario en la expresión de genes participantes en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y en la degradación de aminoácidos, la composición de ácidos grasos de los aceites utilizados fue analizada. Se utilizó al aceite de soya, de coco y oleico como fuentes de grasa debido a que estos aceites tienen diferente composición de ácidos grasos. Nuestros análisis validaron que el aceite de soya es rico en ácidos grasos poliinsaturados (AGP), el oleico en ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y el de coco en ácidos grasos saturados (AGS). En particular el aceite de soya es rico en ácido linoleico (ω 6) (~63%), el aceite oleico en ácido oleico (~71%) y el aceite de coco en ácido laúrico (~58%). Mientras que la proporción AGS/AGM+AGP es mínima para el aceite de soya y oleico (0.2 y 0.03, respectivamente), la del aceite de coco es muy alta con un valor de 7.0 (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios.

Ácido graso (% de la cantidad total)		Aceite de soya	Aceite oleico	Aceite de coco
AGS				
Esteárico	C18:0	3.08	2.26	5.56
Palmítico	C16:0	12.38	-	-
Mirístico	C14:0	0.25	0.64	23.84
Laúrico	C12:0	0.78	-	58.09
Suma		16.49	2.90	87.49
AGM				
Oleico	C18:1	13.59	71.06	10.33
Palmitoleico	C16:1	-	3.83	-
Suma		13.59	74.89	10.33
AGP				
Araquidónico	C20:4	-	0.47	-
α-Linolenico	C18:3 (ω3)	7.29	1.85	-
Linoleico	C18:2 (ω6)	62.63	19.79	2.18
EPA	C20:5	-	-	-
DHA	C22:6	-	0.10	-
Suma		69.92	22.21	2.18
AGS/AGM+AGP		0.20	0.03	6.99
ω6/ω3		8.59	10.70	2.18

AGS, ácidos grasos saturados; AMS, ácidos grasos monosaturados; AGP, ácidos grasos poli-insaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico

Peso y composición corporal

El peso y el consumo de alimento se registró cada dos días. Al término del estudio, los ratones KO PPAR α presentaron una tendencia a ganar menos peso corporal en comparación con los ratones WT. Entre el grupo de ratones WT y KO PPAR α los ratones alimentados con aceite de soya (AS) al 21% ganaron más peso corporal con una ganancia promedio de 10g y 9g, lo que representa el 50% y 39% de ganancia en peso, respectivamente. Por otra parte, los ratones KO PPAR α alimentados con aceite oleico (AO) al 21% fueron los que significativamente ganaron menor peso con sólo 3g, un 12% de ganancia con respecto a su peso inicial. La presencia o ausencia de PPAR α (Genotipo) y el tipo de ácido graso en cada una de las concentraciones (Dieta) tuvieron un efecto significativo sobre el peso de los ratones, ($p=0.0014$ y $p <0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta (Genotipo X Dieta) fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta

son consistentes en la presencia o ausencia del PPAR α ($p < 0.0001$) (Figura 5 A-D). Sin embargo, el alimento consumido (kcal/ratón/día) fue similar entre los grupos dietarios, así como entre los ratones WT y KO PPAR α (Figura 5 E). El contenido calórico de las dietas con 21% de grasa se ajustó de manera isocalórica con un porcentaje determinado de carbohidratos (Tabla 2), por lo que la dieta con 21% de grasa fue una dieta con menor proporción de carbohidratos.

Adicionalmente, los ratones KO PPAR α presentaron una ligera tendencia a tener menor cantidad (% del peso corporal) de tejido adiposo blanco epididimal y retroperirenal comparado con los grupos WT. En particular el peso relativo de estos tejidos fue significativamente mayor en el grupo WT alimentado con AS 21% comparado tanto con ratones WT como con ratones KO PPAR α . Los efectos del genotipo y la dieta sobre el peso del tejido epididimal y retroperirenal fueron significativos ($p=0.0003$ y $p < 0.0001$, para el tejido epididimal; y $p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, para el tejido retroperirenal) (Figura 6 A y B).

Por otra parte, los ratones KO PPAR α registraron en su mayoría un aumento significativo en el peso del hígado. Mientras que, dentro del grupo de ratones WT los hígados del grupo alimentado con AS 21% registró el peso más bajo con respecto al peso corporal. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre el peso del hígado ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p=0.0021$) (Figura 6 C).

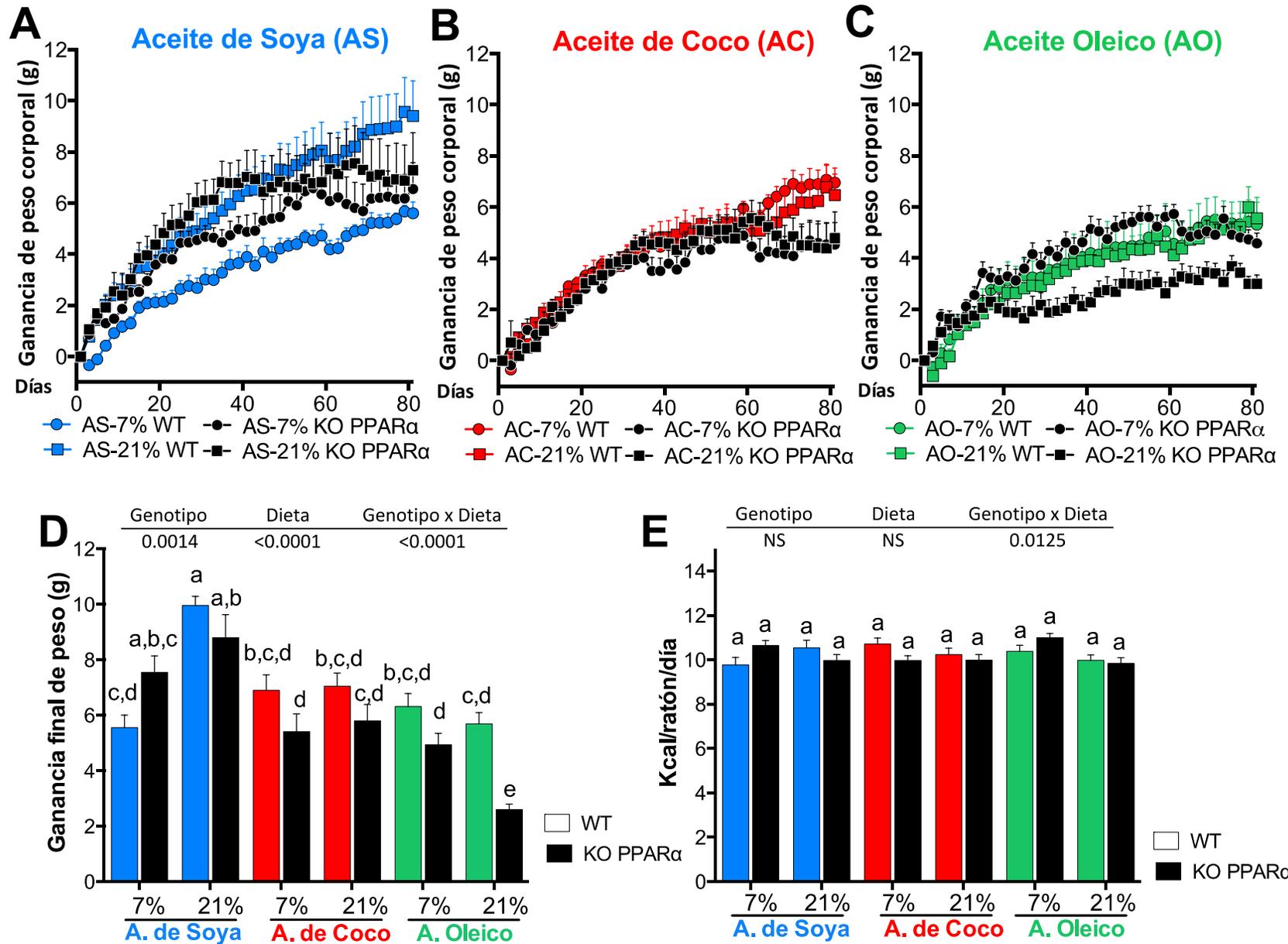


Figura 5. Determinaciones del peso corporal (A, B, C), ganancia final de peso corporal (D) e ingesta media diaria de energía por individuo normalizada por el peso corporal (E). Los valores representan la media \pm S.E.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

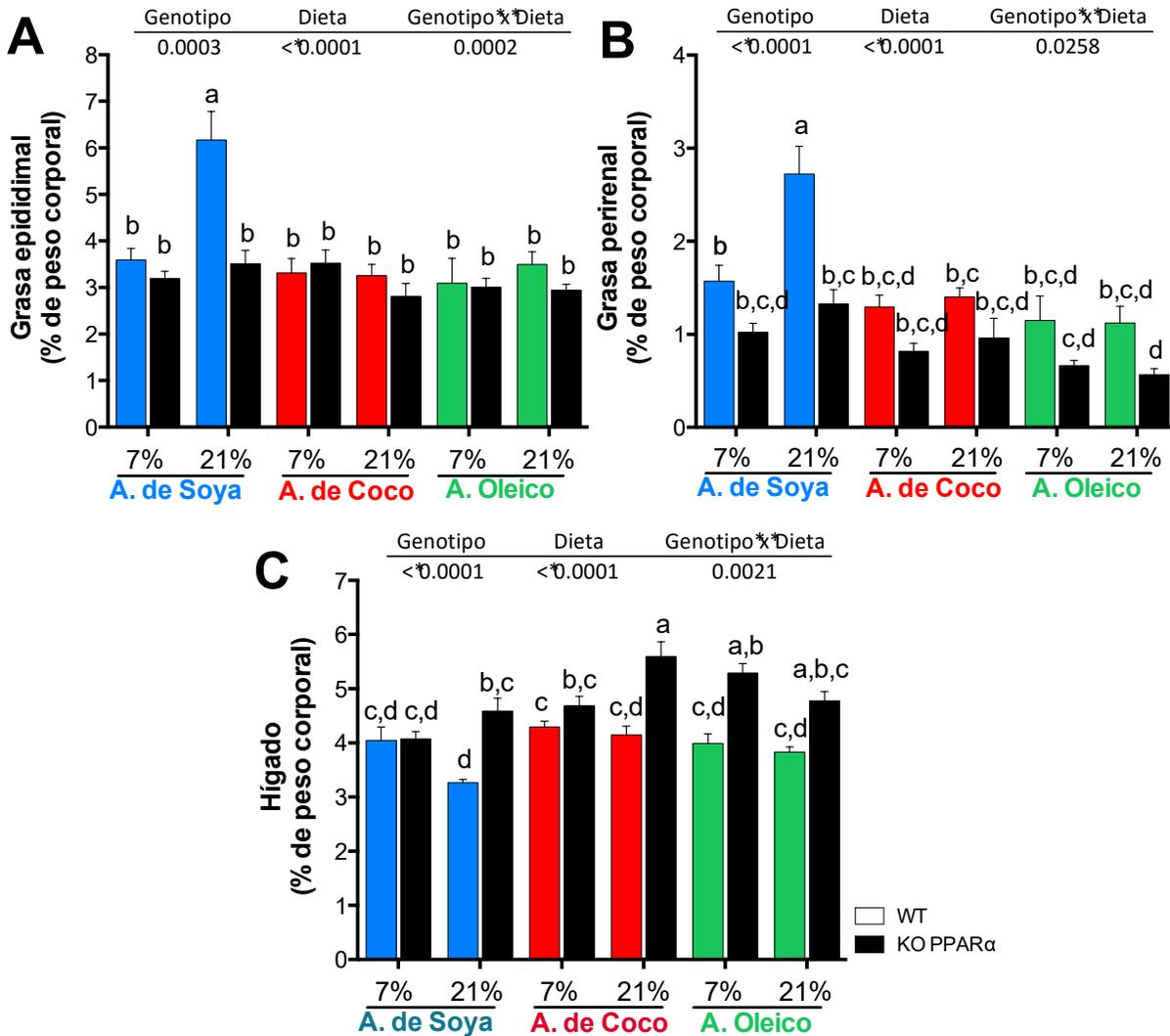


Figura 6. Determinaciones del porcentaje de peso corporal del tejido adiposo epididimal (A), perirenal (B) e hígado (C). Los valores representan la media \pm S.E.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Alteraciones en el metabolismo de la glucosa

En el postprandio (después del consumo de alimento) la insulina predomina y favorece la captura de glucosa y lípidos en el tejido hepático, esquelético y adiposo. Por otro lado, se ha reportado que en los ratones KO PPAR α los niveles de glucagon se encuentran alterados y la secreción de esta hormona favorece procesos catabólicos y la movilización de glucosa. Por ello, en nuestro estudio determinamos la concentración

de glucosa, insulina y glucagon, y el efecto de la presencia o ausencia de PPAR α y la dieta sobre la concentración glucosa y de ambas hormonas.

La concentración de insulina durante el postprandio presenta una ligera tendencia a ser más baja en los ratones KO PPAR α comparado con el grupo WT, aunque fue un poco mayor en el grupo alimentado con AO 7% y casi igual con AC 7%. Por otra parte, los ratones WT alimentados con AS 7% y AC 21% presentaron los niveles más altos de insulina. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la concentración sérica de insulina en el postprandio ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente) (Figura 7 A). Los ratones KO PPAR α evidenciaron un aumento de glucagon de hasta 40% en comparación con los ratones WT. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la concentración sérica de glucagon ($p < 0.0001$ y $p = 0.0011$, respectivamente) (Figura 7 B). Además, se determinó el efecto del genotipo y la dieta sobre la proporción glucagon/insulina, ya que esta razón aumenta cuando hay actividad de gluconeogénesis y disminuye cuando la glucosa es abundante durante el postprandio. La proporción glucagon/insulina fue significativa solamente entre los diferentes tipos de dieta ($p < 0.0001$) y no para el genotipo (Figura 7 C).

Adicionalmente, se determinó la concentración sérica de glucosa además de las concentraciones de insulina, glucagon y la razón insulina/glucagon. Los ratones WT tuvieron una concentración sérica de glucosa en el postprandio de 1.1 a 1.4 veces más elevada en comparación con los ratones KO PPAR α , registrando diferencias significativas por el genotipo ($p < 0.0001$). Aunque no hubo una diferencia significativa por el tipo de dieta; se observó que los ratones KO PPAR α alimentados con AO tanto al 7% como al 21% tuvieron una tendencia a aumentar los niveles séricos de glucosa (Figura 7 D).

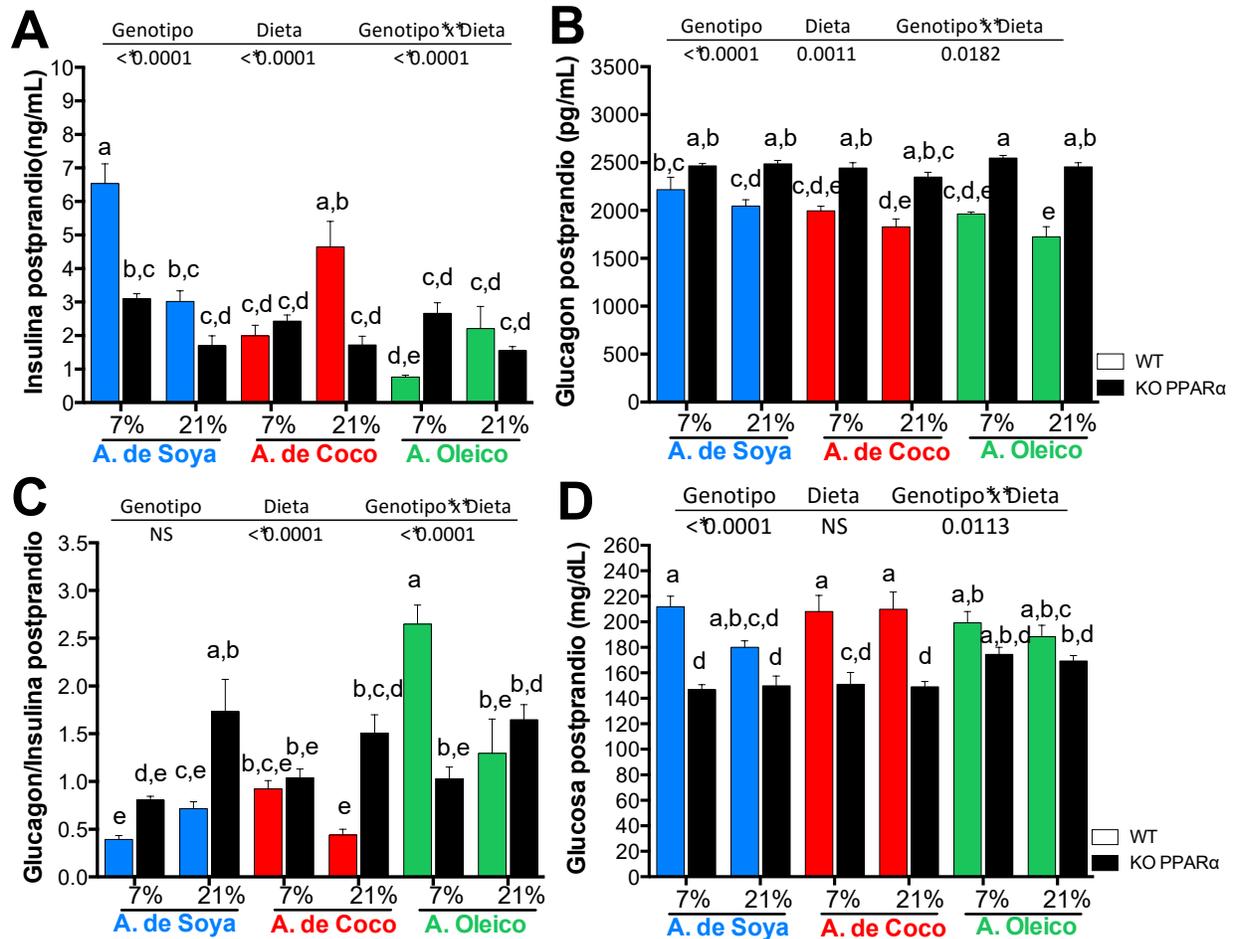


Figura 7. Determinaciones en suero de los niveles séricos de insulina, glucagon y glucosa. La concentración de insulina (A), glucagon (B) y glucosa (C) se determinaron en suero de los ratones WT y KO PPAR α alimentados con dos concentraciones de AGD después de 1 h después del postprandio. Se determinó la razón glucagon/insulina (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Captación de la glucosa

Los datos anteriores (niveles anormales de glucagon/insulina y glucosa durante el postprandio) sugieren que los ratones KO PPAR α presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Para determinar cambios en la asimilación de glucosa en cuerpo completo, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa. Al final de los tres meses de estudio se llevaron a cabo las pruebas de tolerancia a la glucosa, administrándola de manera intraperitoneal y se determinaron los niveles de glucosa a los minutos 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120.

Para distinguir los cambios entre grupos, se determinó el área bajo la curva (AUC) de la concentración de glucosa a los diferentes tiempos de la prueba de tolerancia a la glucosa. Los ratones WT tuvieron un área bajo la curva más elevada en comparación con los ratones KO PPAR α . Por otra parte, dentro del grupo WT se observó una ligera tendencia a tener mayor área bajo la curva en los grupos de ratones alimentados con 21% de grasa dietaria, excepto en el grupo alimentado con AO. Dentro del grupo KO PPAR α se observó que los ratones alimentados con AO tenían niveles de área bajo la curva más elevados en comparación con los demás grupos KO PPAR α , incluso las mediciones se encontraban dentro del mismo rango que los ratones WT.

La presencia o ausencia de PPAR α y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la asimilación de glucosa en cuerpo completo, ($p < 0.0001$ y $p=0.0002$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta (Genotipo X Dieta) fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes en la presencia o ausencia del PPAR α ($p=0.0002$) (Figura 8 A-D).

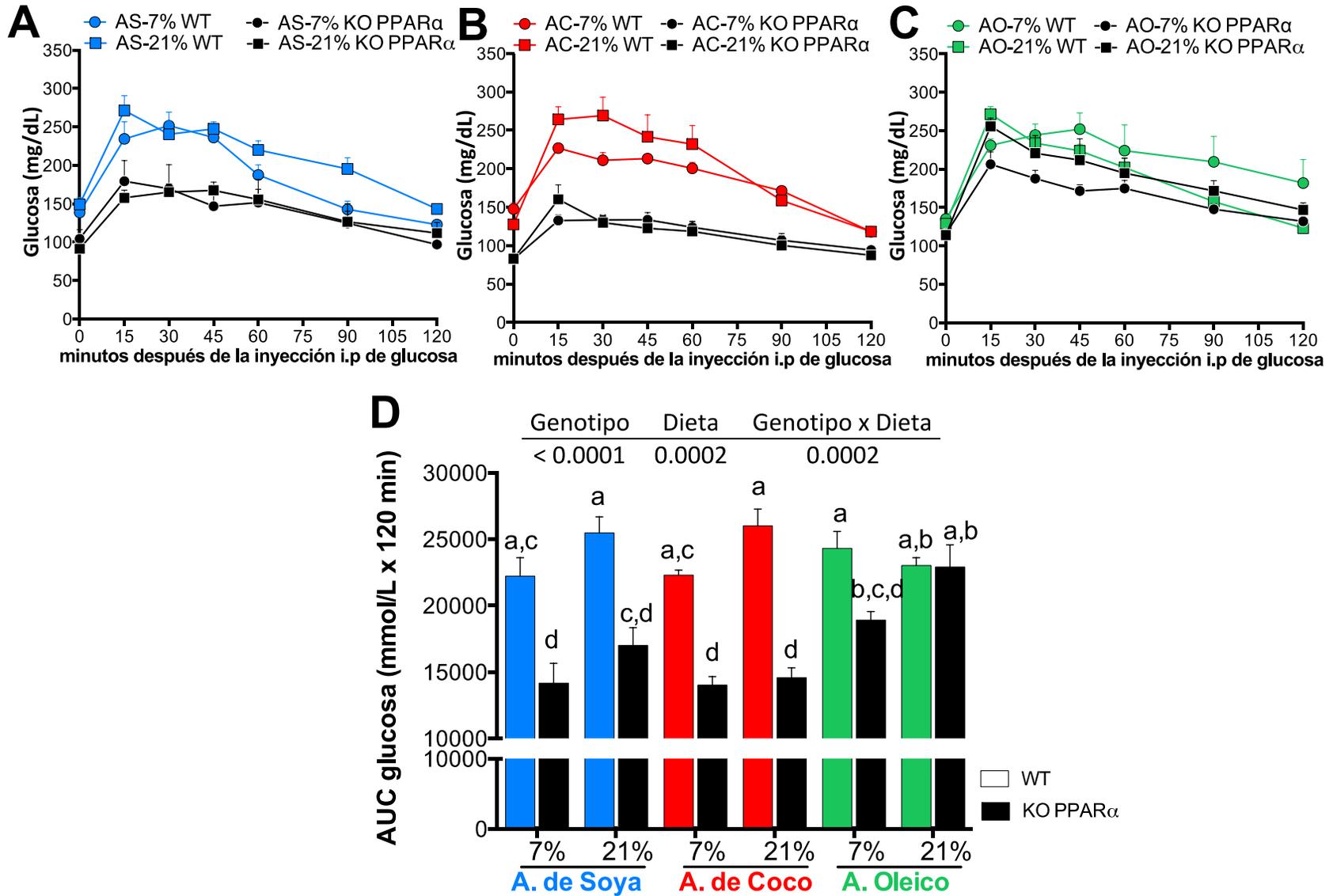


Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO (C) con 12 horas de ayuno, niveles de glucosa en sangre después de una carga de glucosa intraperitoneal (2 g/kg). Área bajo la curva (AUC) (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Gasto energético y modificación del uso de sustratos

Para determinar el efecto de PPAR α sobre el gasto energético y el uso de sustratos, se realizó un ensayo de calorimetría indirecta. Los ensayos de calorimetría indirecta permiten la evaluación del metabolismo respiratorio que determina el volumen de oxígeno (VO₂) consumido y de dióxido de carbono (VCO₂) producido, parámetros con los que se determina el coeficiente de intercambio respiratorio (RER).

$$\text{RER} = \frac{\text{VCO}_2}{\text{VO}_2}$$

La relación entre el VCO₂/VO₂ es un indicador del tipo de sustrato (carbohidrato o grasa) metabolizado por el organismo como fuente de energía. Los hidratos de carbono, lípidos, y proteínas son los tres principales sustratos energéticos que son oxidados para producir energía. Así, las proporciones de VO₂, VCO₂ y la cantidad de energía liberada es diferente para cada uno de los tres sustratos.

Para los carbohidratos, la proporción de VCO₂ a VO₂ es 1.0 y la ecuación general es:



Para los lípidos, la proporción de VCO₂ a VO₂ es 0.705 y la ecuación general es:



Para las proteínas, a pesar de su variabilidad en la composición de aminoácidos se utiliza una ecuación general para la oxidación aproximada de una proteína estándar en la cual la proporción de VCO₂ a VO₂ es 0.81 asumiendo que la urea es el principal producto de desecho es:



Entonces, un RER de 0.7 es indicador de que las grasas son la fuente de energía predominante, mientras que un RER de 0.85 sugiere que está siendo metabolizada una mezcla de grasa y carbohidratos, mientras que un valor de 1 o mayor indica que los carbohidratos están siendo utilizados como la fuente de energía predominante.

Para realizar la calorimetría indirecta, los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con AS, AC y AO en ambas concentraciones de grasa dietaria (7% y 21%), se colocaron en cajas metabólicas individuales durante un periodo de 48 horas. Durante el tiempo que duro el estudio se mantuvo a los ratones con el mismo horario de alimentación de 8 am a 5 pm (10 horas) y ciclo de luz oscuridad de 12 horas.

Para distinguir los cambios entre grupos sobre el fenotipo metabólico referente a la calorimetría indirecta, se determinó el área bajo la curva (AUC) del VO₂ y del RER. En particular, tanto en el ayuno como en el postprandio los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con grasa dietaria al 21% presentaron una ligera tendencia a aumentar su consumo de oxígeno en comparación con los grupo alimentados con 7% de grasa, siendo ésta mayor para los grupos alimentados con AO y menor para los alimentados con AS. En ambos periodos metabólicos los ratones KO PPAR α no presentaron cambios significativos en el VO₂ en comparación con los ratones WT. Sin embargo, el tipo de dieta o ácido graso en las concentraciones dadas tuvo un efecto significativo sobre el VO₂ ($p=0.003$ y $p <0.0001$, respectivamente para ayuno y postprandio) (Figura 9 A-D).

Los valores de RER no se vieron modificados en el ayuno a pesar de los cambios en el consumo de O₂, por lo que los efectos del genotipo y dieta sobre el RER no fueron significativos. En el postprandio, las dietas al 21% de grasa dietaria favorecieron valores de RER menores tanto en los grupos WT como KO PPAR α . En particular los grupo alimentados con AO fueron los que tuvieron valores de RER menores, lo que indica una mayor utilización de lípidos como sustratos energéticos, datos que concuerdan con el VO₂. Los efectos del genotipo y de la dieta sobre el RER fueron significativos ($p=0.003$ y $p <0.0001$, respectivamente). Además, los resultados revelaron una interacción significativa entre el genotipo y la dieta (<0.0001).

Los resultados anteriores demostraron que el efecto sobre el valor del RER es influenciado principalmente por el tipo de dieta y por el genotipo, ya que la ausencia de PPAR α modifica el gasto energético y el uso de carbohidratos y lípidos como sustratos energéticos (Figura 10 A-D).

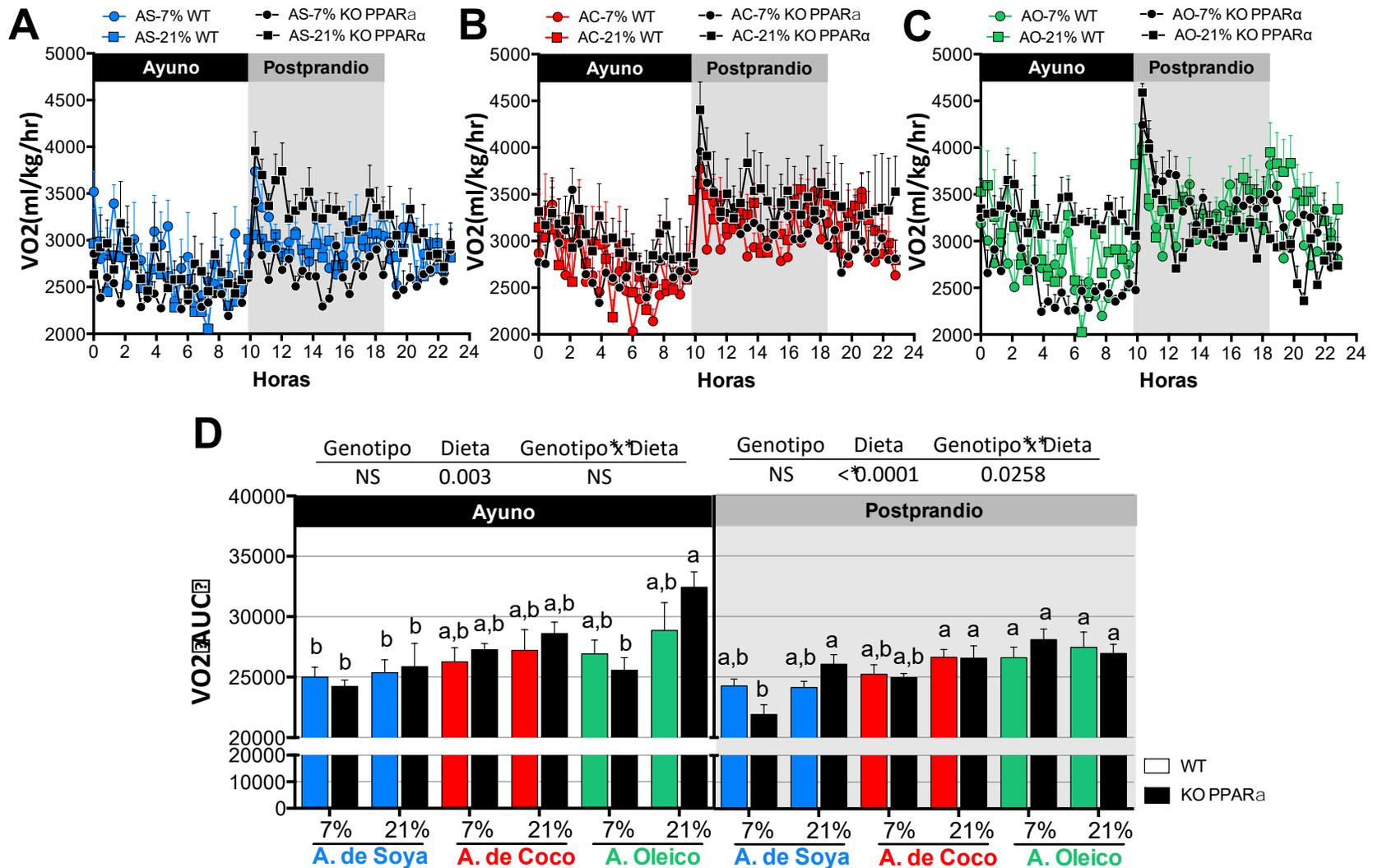


Figura 9. Niveles del consumo de oxígeno (VO_2) en el periodo postprandial y ayuno. Gráfica de los niveles VO_2 con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO (C) al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P <0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

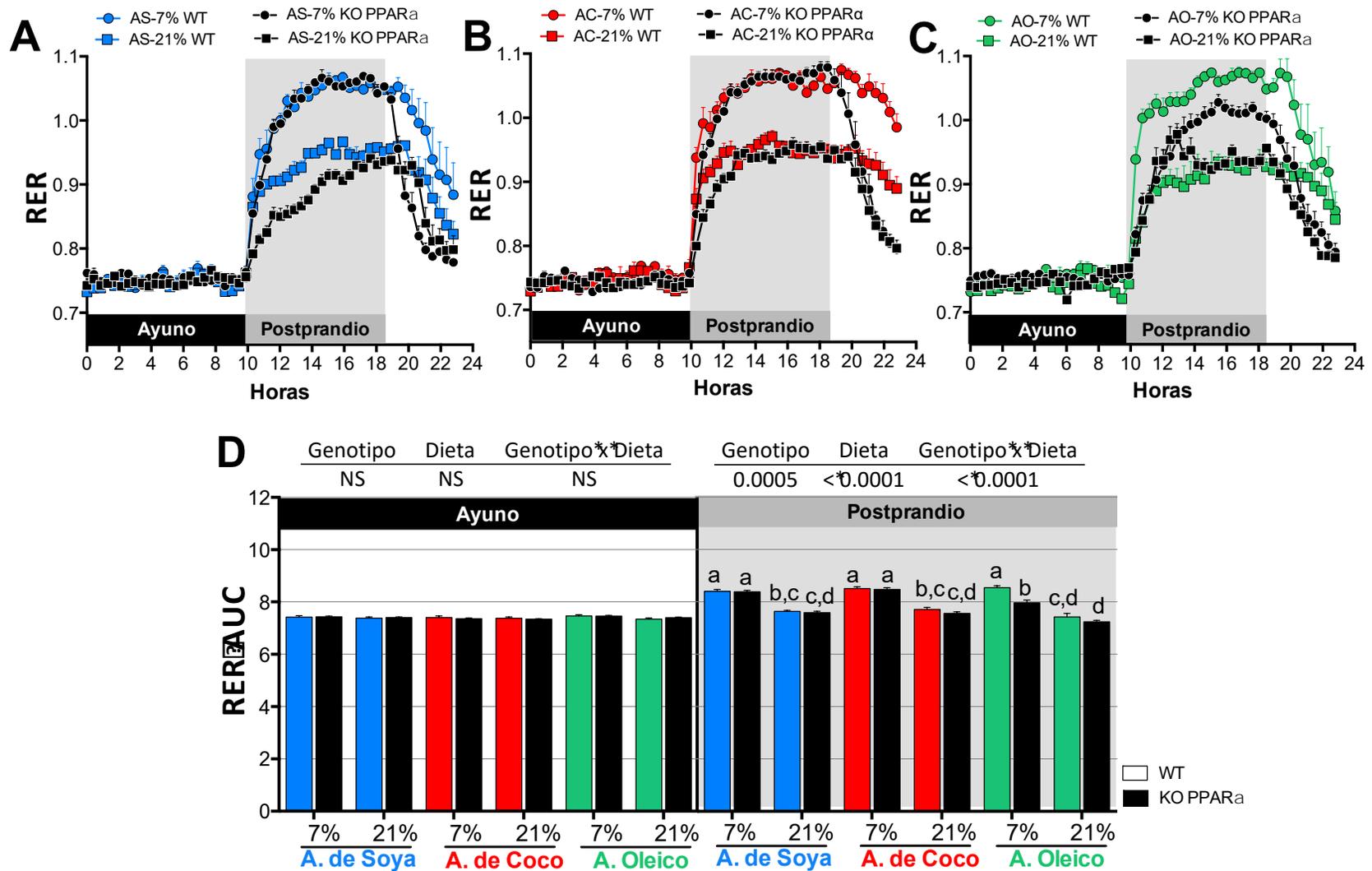


Figura 10. Niveles del RER en el postprandio y ayuno. Gráfica de los niveles RER con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Análisis de la oxidación de carbohidratos y lípidos

La calorimetría indirecta también nos proporciona una estimación del gasto energético (producción de calor) a partir de la tasa de consumo de oxígeno que se transforma en el gasto de energía derivado de carbohidratos o lípidos, y se expresa como la relación entre la energía (Kcal) por el marco de tiempo de la medición (hr). El gasto energético se calcula a partir del "valor calorífico" (VC) que relaciona el volumen de oxígeno consumido con las kilocalorías que se queman por litro de O₂. El VC se deriva de datos empíricos obtenidos por Graham Lusk en "The Elements of the Science of Nutrition" (Tabla 5) (Lusk 1968). Para distinguir los cambios entre grupos sobre el gasto energético, se determinó el área bajo la curva (AUC).

En el ayuno, los ratones KO PPAR α presentaron una tendencia a tener valores más altos del gasto energético en comparación con los ratones WT. En particular los ratones KO alimentados con 21% de AO presentaron los mayores niveles de gasto energético. De hecho, el efecto sobre el gasto energético resultante del genotipo fue principalmente por el genotipo ($p < 0.0001$) y en menor medida por la dieta ($p = 0.0395$), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 11A-D).

En el postprandio, disminuyó la tendencia de los ratones KO PPAR α de tener valores más altos del gasto energético comparados con los WT. Sin embargo, los ratones KO PPAR α alimentados con 7% y 21% de AO presentaron nuevamente los mayores niveles de gasto energético. El efecto del genotipo y la dieta sobre el gasto energético en el postprandio fueron significativos ($p < 0.0001$ y $p = 0.0005$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 11 A-D).

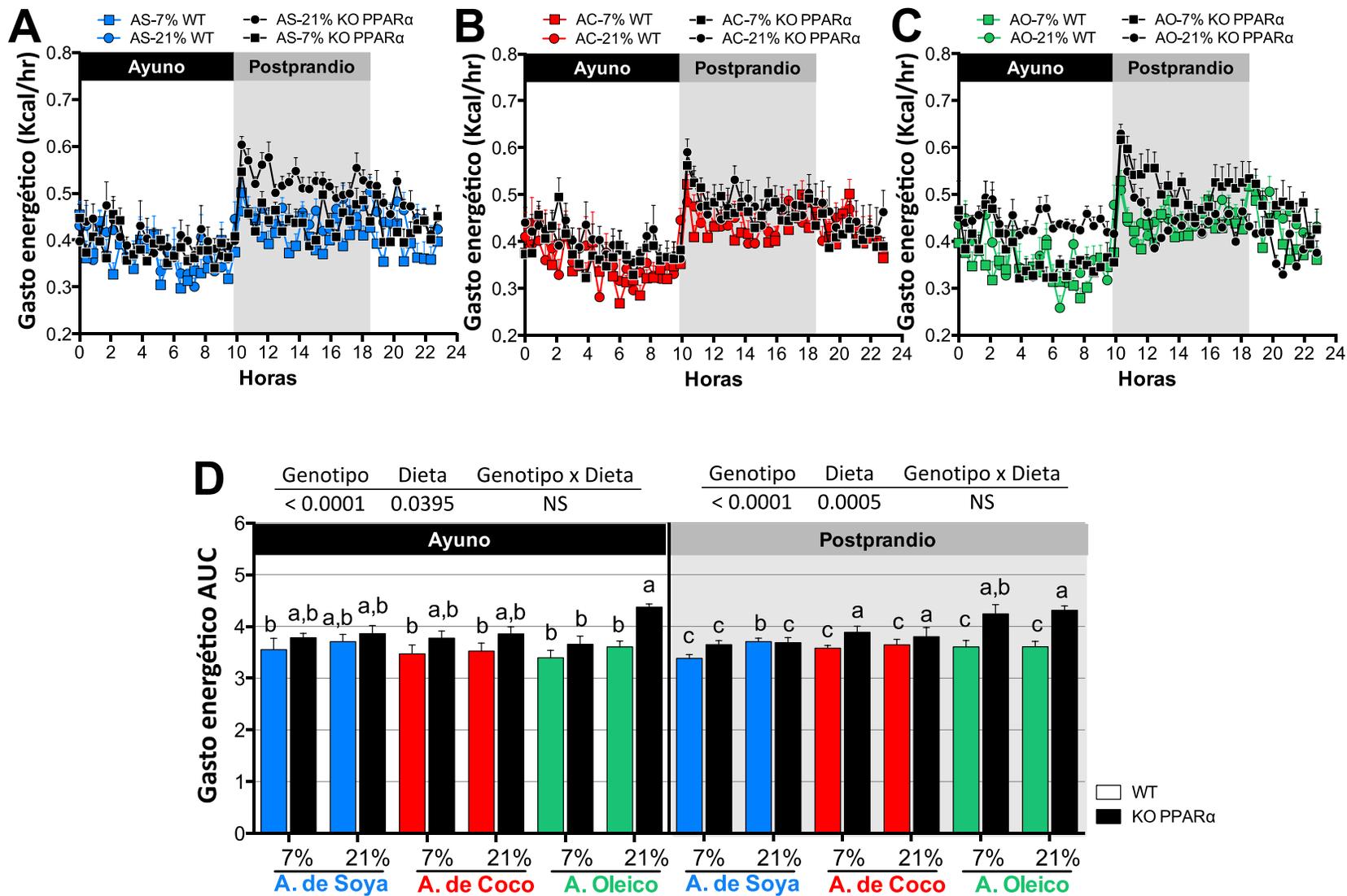


Figura 11. Niveles del gasto energético en el periodo postprandial y ayuno. Gráfica de los niveles de gasto energético con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P <0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

Tabla 5. Oxidación de mezclas de carbohidratos y lípidos

RER	Porcentaje del oxígeno total consumido por		Porcentaje del gasto calórico total producido por		Calorías por litro de O ₂	
	Carbohidratos	Lípidos	Carbohidratos	Lípidos	Número	Logaritmo
0.707	0	100.00	0	100.00	4.686	0.67080
0.71	1.02	99.00	1.10	98.90	4.690	0.67117
0.72	4.44	95.60	4.76	95.20	4.702	0.67228
0.73	7.58	92.20	8.40	91.60	4.714	0.67339
0.74	11.30	88.70	12.00	88.00	4.727	0.67459
0.75	11.47	85.50	15.60	84.40	4.739	0.67569
0.76	18.10	81.90	19.20	80.80	4.751	0.67679
0.77	21.50	78.50	22.80	77.20	4.764	0.67797
0.78	24.90	75.10	26.30	73.70	4.776	0.67906
0.79	28.30	71.70	29.90	70.10	4.788	0.68015
0.8	31.70	68.30	33.40	66.60	4.801	0.68133
0.81	35.20	64.80	36.90	63.10	4.813	0.68242
0.82	38.60	61.40	40.30	59.70	4.825	0.68350
0.83	42.00	58.00	43.80	56.20	4.838	0.68467
0.84	45.40	54.60	47.20	52.80	4.850	0.68574
0.85	48.80	51.20	50.70	49.30	4.862	0.68681
0.86	52.20	47.80	54.10	45.90	4.875	0.68797
0.87	55.60	44.40	57.50	42.50	4.887	0.68904
0.88	59.00	41.00	60.80	39.20	4.899	0.69011
0.89	62.50	37.50	64.20	35.80	4.911	0.69117
0.9	65.90	34.10	67.50	32.50	4.924	0.69232
0.91	69.30	30.70	70.80	29.20	4.936	0.69338
0.92	72.70	27.30	74.10	25.90	4.948	0.69443
0.93	76.10	23.90	77.40	22.60	4.961	0.69557
0.94	79.50	20.50	80.70	19.30	4.973	0.69662
0.95	82.90	17.10	84.00	16.00	4.985	0.69767
0.96	86.30	13.70	87.20	12.80	4.998	0.69880
0.97	89.30	10.20	90.40	9.58	5.010	0.69984
0.98	93.20	6.83	93.60	6.37	5.022	0.70088
0.99	96.60	3.41	96.80	3.18	5.035	0.70200
1.00	100.00	0	100.00	0	5.047	0.70303

Para determinar el efecto del PPAR α sobre el tipo de sustratos oxidados, se determinaron los valores del gasto energético obtenidos a partir de la calorimetría indirecta y de las tablas de Lusk (Tabla 5). Los valores obtenidos del gasto energético se relacionaron con los porcentajes de carbohidratos o lípidos oxidados en los diferentes tratamientos.

En el ayuno no se vieron modificaciones en el porcentaje de oxidación de carbohidratos y lípidos, ya que en promedio los ratones oxidaron entre un 12-16% de carbohidratos y entre un 84-88% de lípidos. Durante el postprandio los ratones WT y KO PPAR α alimentados con 7% de grasa dietaria oxidaron principalmente carbohidratos. Por otra parte, las diferencias más evidentes con respecto al tipo de dieta se observaron entre los grupos alimentados con 21% de grasa dietaria. Los ratones WT y KO PPAR α alimentados con AS 21% oxidaron en promedio un 77% de carbohidratos y un 23% de lípidos; los alimentados con AC 21% oxidaron un 81%(WT) y 75% (KO PPAR α) de carbohidratos, además de un 19% (WT) y 26% (KO PPAR α) de lípidos. Por último, los ratones alimentados con AO 21% son los que presentaron un mayor porcentaje de oxidación de lípidos, ya que oxidaron un 29%(WT) y 39% (KO PPAR α) de lípidos, además de un 71% (WT) y 61% (KO PPAR α) de carbohidratos (Figura 12).

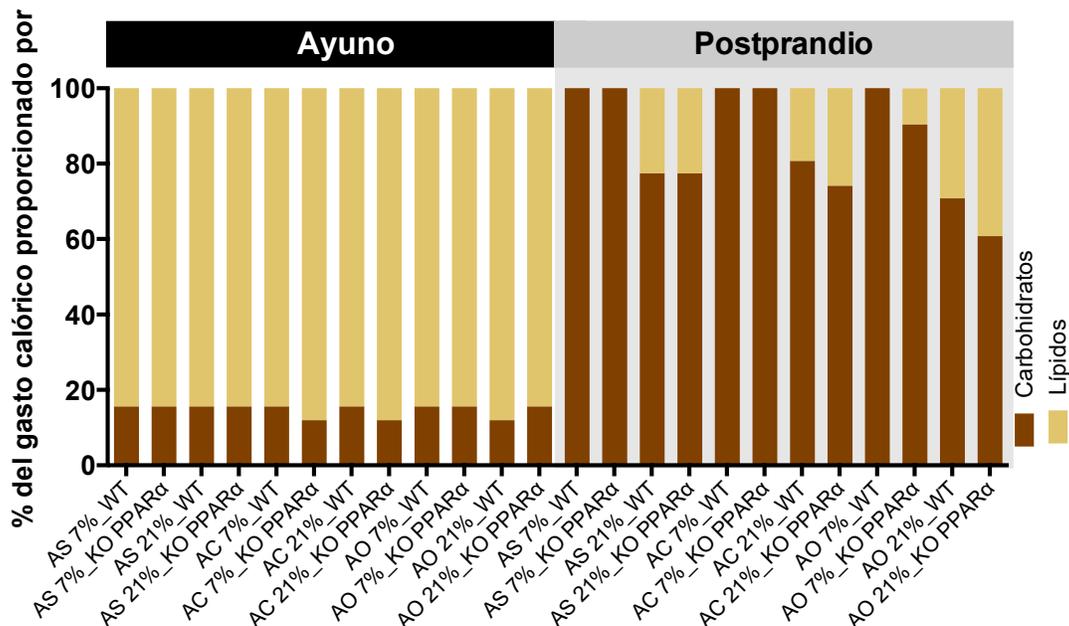


Figura 12. Porcentaje del valor promedio del gasto calórico proporcionado por carbohidratos y lípidos para cada uno de los tratamientos dietarios.

Parámetros lipídicos y lipoproteícos en plasma

Debido a que la composición de ácidos grasos de los aceites y el contenido de grasa dietaria son factores importantes en la modulación del metabolismo de lípidos, y afectan directamente el perfil de lípidos y lipoproteínas en suero, se determinaron los niveles séricos de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL en el postprandio.

Después de la alimentación, los niveles de colesterol total fueron mayores en los ratones KO PPAR α en comparación con los ratones WT. Mientras que los grupos alimentados con AC en ambas concentraciones 7% y 21%, tanto en ratones WT como ratones KO PPAR α , registraron los niveles más altos de colesterol en suero, siendo mayores para el grupo con 21% que para el grupo al 7% de grasa dietaria. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 A).

Los ratones KO PPAR también evidenciaron un aumento en las concentraciones de LDL en comparación con los ratones WT. De manera similar a los niveles de colesterol total, los niveles de LDL en los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con AC registraron los niveles más altos de LDL en suero, en concentraciones similares entre los grupos alimentados con 7% y 21% de grasa. Es interesante que, los grupos WT y KO PPAR α alimentado con AS 21% registraron los niveles más bajos de LDL. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de LDL ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 B).

Las concentraciones de HDL al igual que el LDL y el colesterol total, también se mantuvieron aumentadas en los ratones KO PPAR α . Dentro de los grupos WT, los niveles más elevados los registraron los grupos alimentados con AC tanto al 7% como al 21%. Mientras que, entre los grupos KO PPAR α los grupos alimentados con AC y AO registraron los niveles más elevados de HDL. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de HDL ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), tampoco se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 C).

Al igual que las variables bioquímicas anteriores, la concentración de triglicéridos también fue sensible al genotipo ($p=0.004$), los ratones KO PPAR α mostraron una tendencia a tener niveles más altos de triglicéridos en comparación con los grupos WT, con excepción del grupo alimentado con AS 21% donde el efecto fue inverso. Por otro lado, entre los grupos WT los alimentados con 21% de grasa muestran una tendencia a tener niveles más elevados de triglicéridos en comparación con los grupos alimentados con 7% de grasa, exceptuando al grupo ambientado con 21% de AO. La dieta no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de triglicéridos, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa, el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p < 0.0001$) (Figura 13 D).

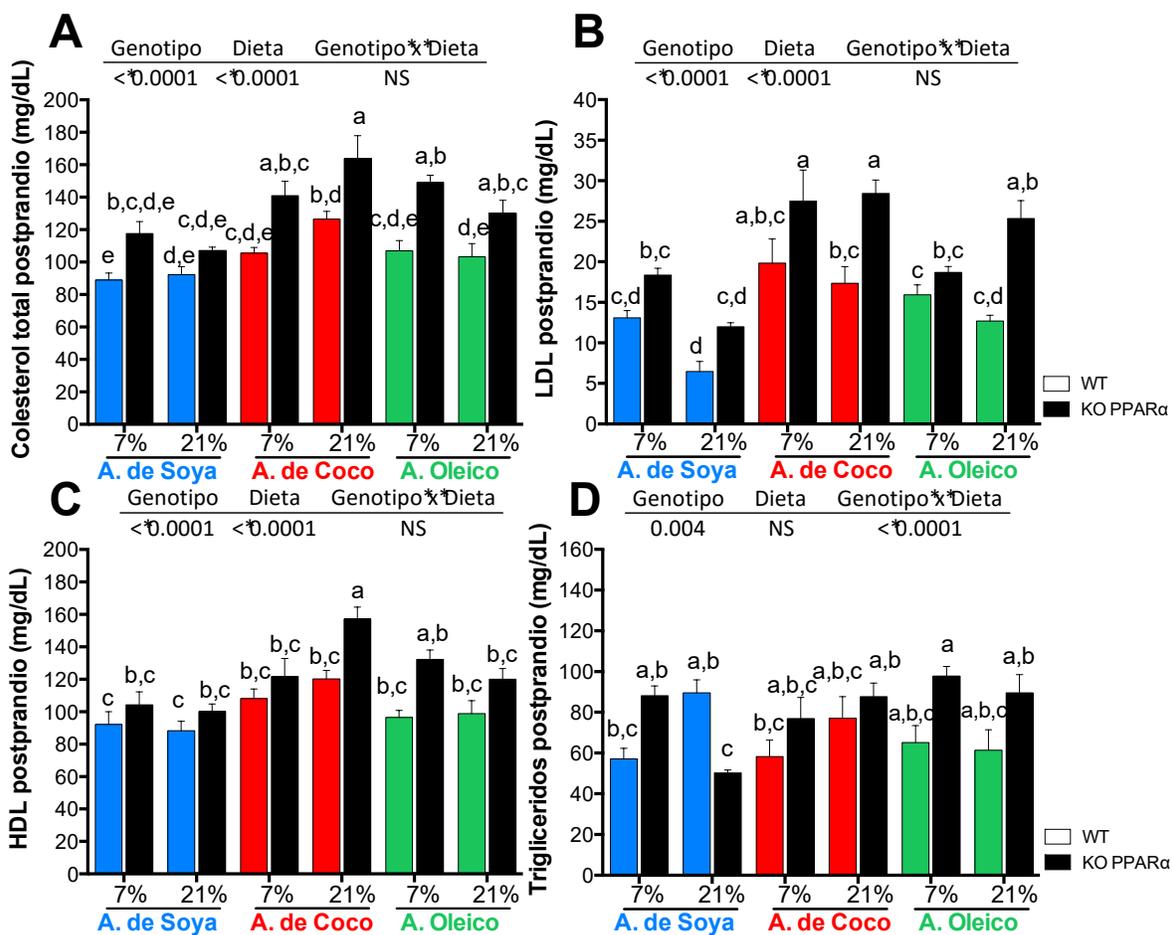


Figura 13. Determinaciones en suero de los niveles de colesterol total (A), LDL (B), HDL (C) y triglicéridos (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Vías metabólicas reguladas por el PPAR α , el tipo y la cantidad de ácidos grasos

El PPAR α tiene un papel clave en la regulación de las vías metabólicas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos (principalmente en la oxidación) y también en la degradación de aminoácidos, recientemente descrito. Además, se sabe que los ácidos grasos dietarios juegan un papel importante como reguladores de la expresión génica, ya que son ligandos exógenos de PPAR α como lo son los AGP. Por lo anterior y a partir de los cambios observados en los ratones KO PPAR α en cuanto al uso de sustratos energéticos, se identificaron las alteraciones en las vías metabólicas reguladas por el PPAR α y por el tipo de ácido graso. Para ello se determinó en el hígado el patrón de expresión de los genes involucrados en degradación de ácidos grasos (PPAR α , PPAR δ , PGC1 α , ACOX1 y CPT1 α), síntesis de ácidos grasos (SREBP1, PPAR γ , SCD1, ACC y FAS) y de la degradación de aminoácidos (HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa).

Oxidación de ácidos grasos

La expresión de PPAR α registró niveles despreciables en los ratones KO PPAR α , mientras que, entre los grupos WT el efecto por el tipo de dieta fue mayor para los grupos alimentados con AO en ambas concentraciones 7% y 21%, y menor para los grupos alimentados con AS (Figura 14 A). La expresión del PPAR α estuvo influenciada por el genotipo ($p < 0.0001$) y por el tipo de dieta ($p < 0.0001$), junto con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). En particular, el PGC1 α se encontraba principalmente sobre-expresado en los grupos de ratones KO PPAR α alimentados con AS al 7% y 21%, a diferencia de los grupos alimentados con AC o AO, que tuvieron niveles de expresión menores que los grupos WT, por ello el genotipo no tuvo un efecto significativo sobre la expresión del PGC1 α . En los grupos WT se observó que los ratones alimentados con AO, seguidos por los alimentados con AC fueron los que tuvieron mayores niveles de PGC1 α en comparación con los alimentados con AS. La dieta tuvo un efecto significativo sobre la expresión del PGC1 α ($p < 0.0001$). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa ($p < 0.0001$) (Figura 14 B).

Es interesante que, a pesar de que los ratones KO PPAR α carecen de PPAR α funcional se observó un nivel de expresión considerable en el grupo de genes que se encuentran regulados río abajo de PPAR α . Por un lado, los niveles de expresión de ACOX1 se vieron influenciados por el genotipo y la dieta ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa ($p < 0.0001$). De este modo, los ratones KO PPAR α alimentados con AS al 7% y 21% fueron los grupos que tuvieron mayor expresión de ACOX1, seguidos por el grupo alimentado con AC al 7%. Por otro lado, entre los ratones WT se encontró que los grupos alimentados con AO al 7% y 21%, además del grupo de AC 21% son los que tienen mayormente expresado a ACOX1. Mientras que, los grupos alimentados con AS presentaron los niveles más bajos de expresión de ACOX1 (Figura 14 C). Además, la expresión de CPT1 α también se vio influenciada por el genotipo y la dieta ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). La expresión de CPT1 α fue mayor en los grupos WT alimentados con AO al 7% y 21%, seguido por el grupo alimentado con AC 21% y en menor cantidad por los grupos alimentados con AS en ambas concentraciones. Un comportamiento similar se mostró en los grupos KO PPAR α , con la particularidad que los grupos alimentados con AS y AC tuvieron una mayor expresión de esta enzima, principalmente en el grupo con 7% de grasa (Figura 14 D).

Por último, se determinaron los niveles de expresión del gen PPAR δ , ya que nos fue de interés determinar el posible papel de PPAR δ en la suplencia de función de PPAR α en los ratones KO PPAR α . De manera interesante, se observó que los grupos KO PPAR α tuvieron una tendencia a tener más elevada la expresión de PPAR δ en comparación con los ratones WT, dentro de este mismo grupo se observó que los ratones alimentados con AS al 7% y 21% al igual que el AC al 7% fueron los grupos con los niveles más elevados de expresión de PPAR δ (Figura 14 E).

Oxidación de ácidos grasos

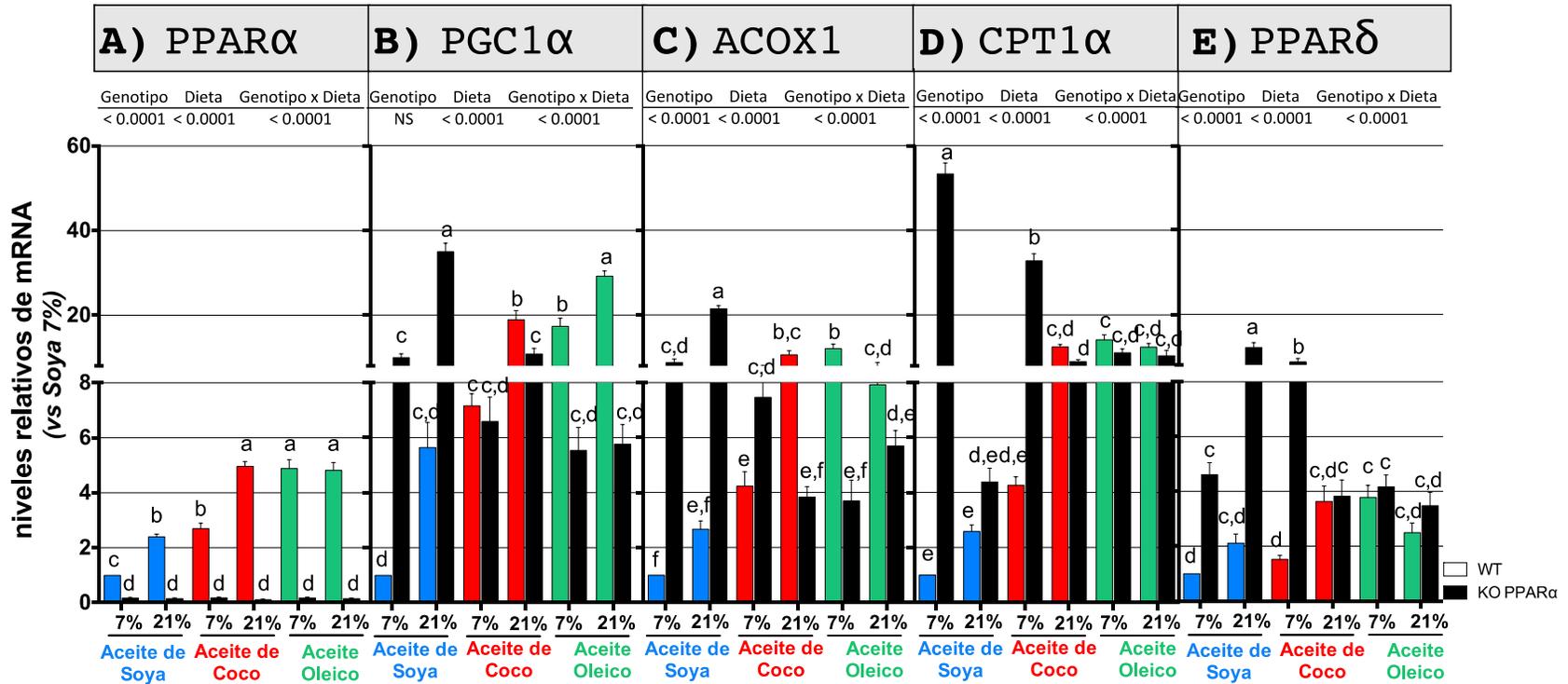


Figura 13. Niveles relativos de mRNA de los genes PPAR α , PGC1 α , ACOX1, CPT1 α y PPAR δ normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P <0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

Síntesis de ácidos grasos

Los niveles de expresión de SREBP1 y PPAR γ no fueron afectados por el genotipo, solamente por el tipo de dieta ($p < 0.0001$). Así mismo, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa ($p < 0.0001$). En los grupos de ratones KO PPAR α los ratones alimentados con ambas concentraciones de AS tuvieron los niveles más altos de expresión de SREBP1, seguidos por el grupo alimentado con AC al 21%. Por otra parte, entre los grupos WT los ratones alimentados con AS tuvieron los niveles más bajos de expresión de este gen en comparación con los ratones alimentados con AC o AO en ambas concentraciones (Figura 15 A). Mientras que, los niveles de expresión del PPAR γ mostraban una tendencia a aumentar en los grupos WT alimentados con 21% de grasa, exceptuando al grupo alimentado con AO. Además, los grupos KO PPAR α alimentados con AO y AS al 7% tuvieron los niveles más altos de expresión de PPAR γ (Figura 15 B).

De manera interesante los niveles de expresión de SCD1, ACC y FAS siguieron un patrón muy parecido de expresión entre los grupos WT, ya que ambos grupos alimentados con AS (7% y 21%) mantenían niveles de expresión muy parecidos; los ratones alimentados con AC al 21% mostraban tener una menor expresión de estos genes y los grupos alimentados con AO AS (7% y 21%) tuvieron los niveles más bajos de SCD1, ACC y FAS. En particular, se observó que la expresión de genes lipogénicos en hígado es baja a concentraciones de 21% de grasa. En los grupos KO PPAR α se observó una tendencia de baja expresión de SCD1, exceptuando los grupos alimentados con AS al 21% y AC al 7%. Interesantemente, se observó que los grupos KO PPAR α alimentados con AS al 7% y con AC al 7% mostraban los niveles más altos de ACC y FAS, mientras que los demás grupos de dieta mostraban una disminución en la expresión de estos genes (Figura 15 C, D, E). En cuanto a los niveles de expresión de la SCD1, ACC y FAS se encontró un efecto significativo por la dieta y por el genotipo ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además de mostrar una fuerte interacción entre genotipo y el tipo de dieta, la cual fue significativa ($p < 0.0001$).

Síntesis de ácidos grasos

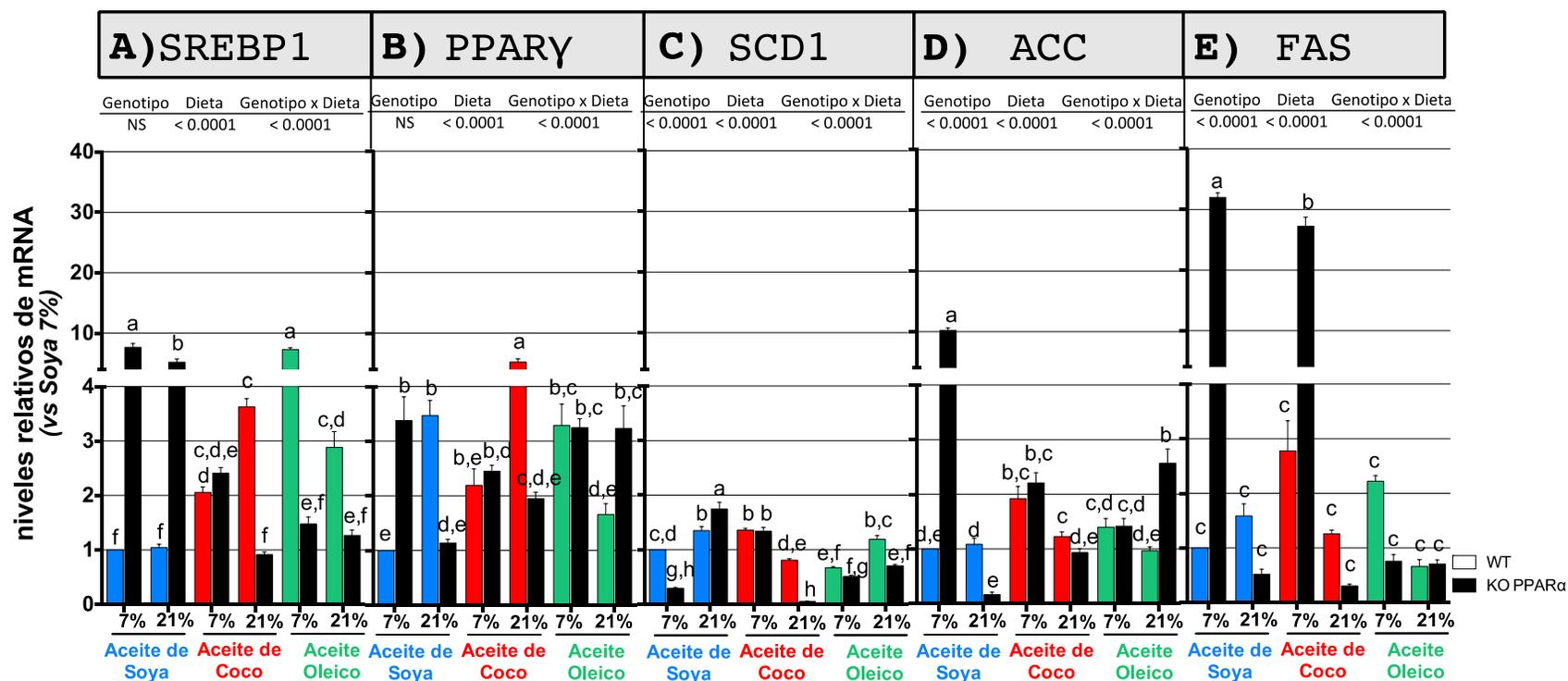


Figura 15. Niveles relativos de mRNA de los genes SREBP1, PPAR γ , SCD1, ACC, FAS normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Degradación de aminoácidos

Se determinó la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos en tejido hepático, debido a que los ratones KO PPAR α presentaron alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, además del incremento en los niveles de glucagon independiente del tipo de ácido graso. En reportes previos se ha relacionado que el glucagon estimula la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos (Alemán et al. 1998).

En los ratones KO PPAR α los genes que codifican para las enzimas degradadoras de aminoácidos (HAL, SDH y glutaminasa) y de HNF4 α incrementaron su expresión en comparación con los grupos WT, exceptuando los grupos alimentados con AO y los grupos alimentados con AC al 21% quienes presentaron niveles muy cercanos de expresión a los del grupo WT correspondiente. La expresión de HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa estuvo influenciada por el genotipo ($p < 0.0001$) y por el tipo de dieta ($p < 0.0001$), junto con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). Es decir, que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta es consistente ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p = 0.0021$) (Figura 16 A-D).

La expresión de HNF4 α se encontró particularmente alta en los ratones KO PPAR α , siendo los grupos alimentados con AS al 7% y 21% y AC al 7% los grupos con los niveles más altos de expresión (Figura 16 A). De igual modo, aunque en menor grado la expresión de HAL presentó una tendencia a ser mayor en los grupos KO PPAR α , con los mayores niveles de expresión en los grupos alimentados con AS al 7% y con AC al 7% (Figura 16 B). De manera semejante los grupos alimentados con AS al 7% y 21% y AC al 7% tuvieron los niveles más altos de expresión de SDH y glutaminasa (Figura 16 C,D). Entre los ratones WT, es interesante observar que los grupos alimentados con AO en ambas concentraciones (7% y 21%) presentan un ligero incremento en la expresión de HAL, SDH y glutaminasa, seguido por los grupos alimentados con AC y por último en menor cantidad los grupos alimentados con AS. (Figura 16 A-D).

Degradación de aminoácidos

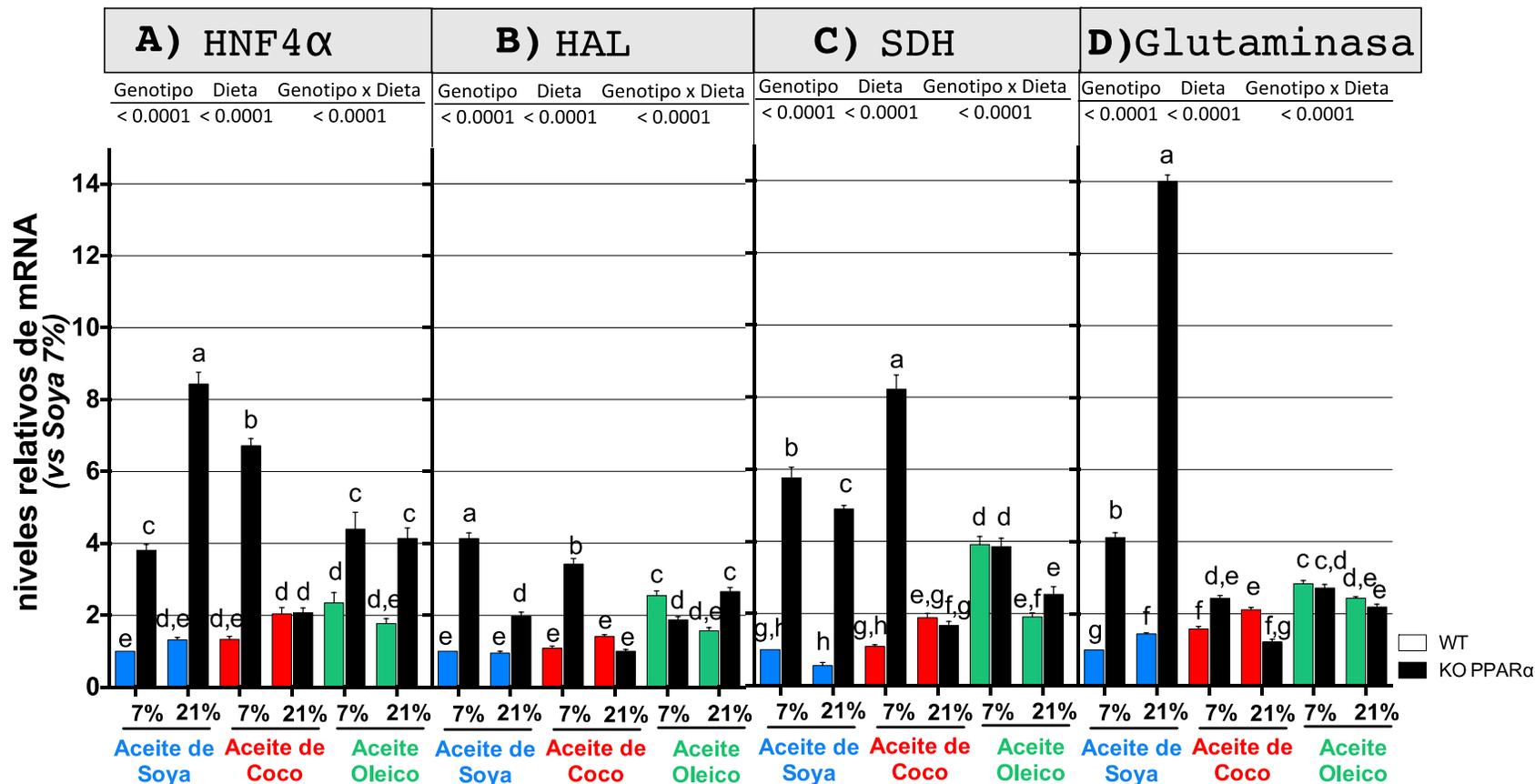


Figura 16. Niveles relativos de mRNA de los genes HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P < 0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

A continuación se presenta el mapa de color de la expresión de genes involucrados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y degradación de aminoácidos en los ratones WT y KO PPAR α en el postprandio alimentados previamente con las dos concentraciones de aceites dietarios (AS, AC y AO). Los mapas de color se utilizaron como una herramienta para facilitar la visualización de los niveles de expresión de los genes. De esta manera, se pueden identificar los genes con valores de expresión más altos o más bajos con respecto al control biológico (grupos alimentados con AS al 7%). En los ratones KO PPAR α , los genes que codifican para las enzimas degradadoras de aminoácidos incrementaron su expresión en comparación con los grupos WT (Figura 17).

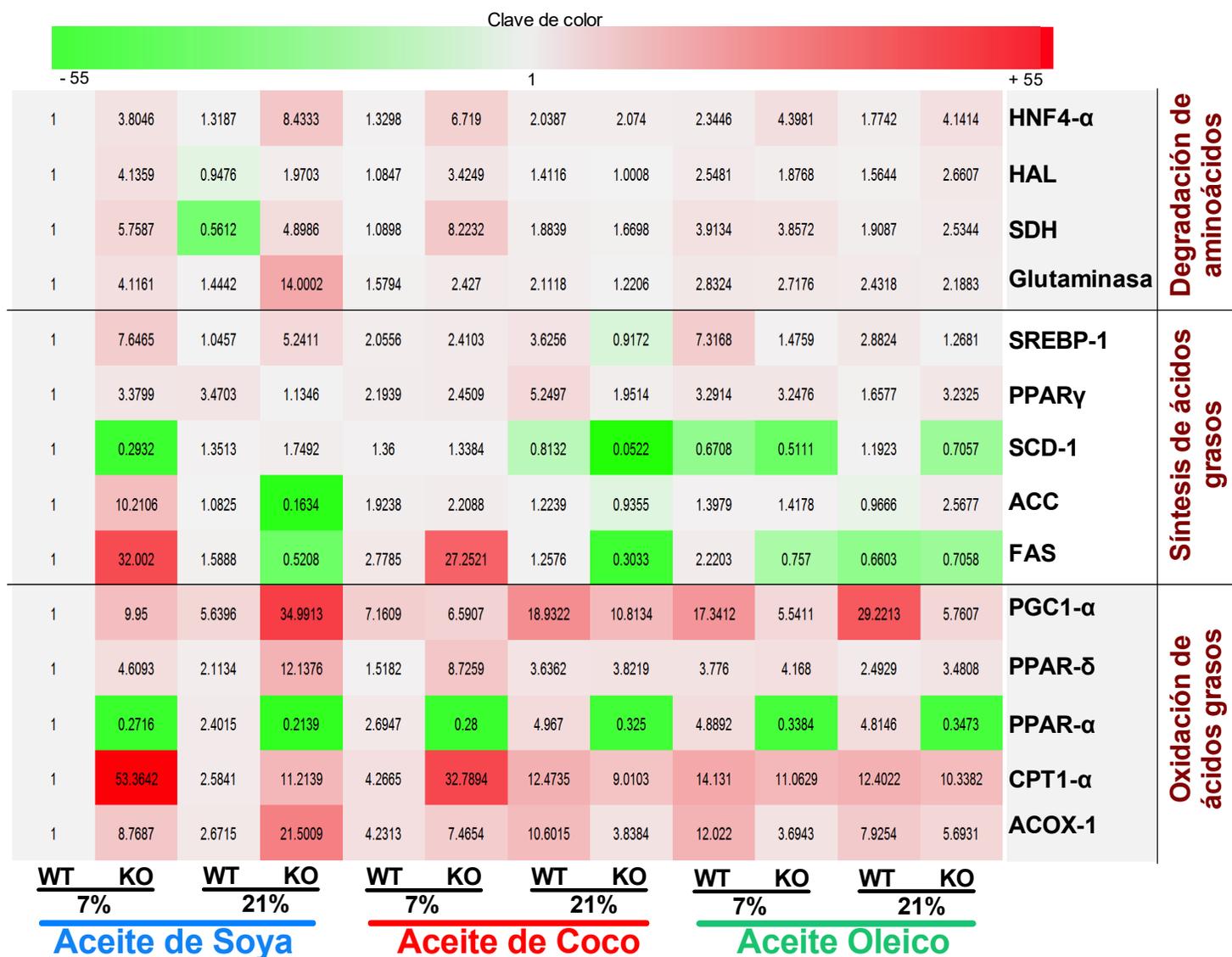


Figura 17. Mapa de color de los niveles relativos de mRNA de los genes involucrados en oxidación y síntesis de ácidos grasos y degradación de aminoácidos normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β_2 microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Discusión

Algunos factores de transcripción desde el punto de vista de nutrición funcionan como sensores de los nutrientes en el interior de la célula y son regulados por la presencia y cantidad de nutrientes específicos. Este es el caso de PPAR α que se expresa principalmente en hígado y es regulado por ácidos grasos poliinsaturados e interacciona con los ácidos grasos con altos valores de afinidad (Lin et al. 1999). El tamaño del sitio de unión a ligando del PPAR α es entre 3 a 4 veces mayor que el de cualquier otro receptor nuclear y es por eso que tiene la capacidad de unir una gran variedad de ácidos grasos con constantes de disociación (K_d s) dentro del rango de nanomoles (nM) tal es el caso para el ácido oleico, linoleico y linolénico (5.9, 4.8 y 7.9 nM, respectivamente) (Krey et al. 1997).

Desde el punto de vista de la nutrigenómica, es importante conocer la importancia de la presencia de PPAR α en la regulación del metabolismo de lípidos y aminoácidos, ya que previos estudios en el laboratorio han demostrado que al activar PPAR α por ácidos grasos poliinsaturados aumenta la oxidación de ácidos grasos y se inhibe el catabolismo de aminoácidos (Contreras et al. 2015; Alemán et al. 2013), un mecanismo muy importante para la conservación del nitrógeno corporal, por ello se utilizó el modelo KO PPAR α .

De igual manera, es importante conocer qué tipo de ácido graso puede ser ligando de PPAR α y qué cantidad de este ácido graso es óptima para estimular la oxidación de ácidos grasos y poder dar una mejor recomendación para el consumo humano. Debido a que existe cierta controversia sobre si un tipo de ácido graso es mejor que otro, se estudiaron tres tipos de aceites con diferentes composiciones de ácidos grasos: aceite de soya (AS, 70% de ácidos grasos poliinsaturados), de coco (AC, 88% de ácidos grasos saturados) y oleico (AO, 71% de ácidos grasos monoinsaturados). Se evaluaron los efectos de la concentración recomendada (7%) de grasa dietaria y de tres veces el requerimiento (21%) (Reeves, Nielsen, and Fahey 1993).

De manera interesante se observó que las concentraciones de insulina dependen del tipo de aceite. En el postprandio los ratones WT alimentados con AS al 7% y AC al

21% (AS 7%>AC 21%) tuvieron los niveles más altos de insulina aunque tuvieron niveles normales de glucosa. Por otro lado, se observó que los ratones WT alimentados con AO tuvieron un aumento en la proporción de glucagon/insulina (7%>21%) aunque no presentaron cambios en los niveles de glucosa. También se observó que el área bajo la curva fue ligeramente mayor para los grupos WT alimentado con AC al 21% y AS al 21%.

Por otra parte, los ratones KO PPAR α tuvieron considerablemente niveles más altos de glucagon y bajos niveles de glucosa. Resultados que se corroboraron con las determinaciones del área bajo la curva en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, no obstante los grupos KO PPAR α alimentados con AO al 7% y 21% fueron la excepción ya que los niveles de glucosa y el área bajo la curva en la prueba de tolerancia oral a la glucosa fueron parecidos a los del grupo WT. Estudios previos muestran que los ratones KO PPAR α mantienen niveles muy bajos de glucemia inclusive en dietas altas en grasa (Guerre-Millo et al. 2001). Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos que influyen en la hipoglucemia inducida por la deficiencia de PPAR α . Además, estudios previos de nuestro grupo también reportan las altas concentraciones de glucagon en los ratones KO PPAR α en comparación los ratones WT (Contreras et al. 2015). En particular, en nuestro estudio los grupos KO PPAR α alimentados con AO fueron la excepción a este supuesto. Los resultados anteriores coinciden con los reportados efectos benéficos del AO en desórdenes del metabolismo de la glucosa (Sato et al. 2007). Estudios *in vitro* e *in vivo* corroboran la actividad gluconeogénica del AO (Williamson et al. 1968; Boyd, Whitehead, and Butler 1985). También se discute que al inducir una mayor oxidación de ácidos grasos se estimula la producción y aumento en los niveles de glucosa por gluconeogénesis (Oakes et al. 1997).

En los ratones KO PPAR α la baja concentración de glucosa sérica y la consecuente secreción exacerbada de glucagon, estimuló un mayor catabolismo de aminoácidos (mayor expresión de EDAA) resultados que concuerdan con los reportados por Kersten et al. (2001). Sin embargo, en nuestro estudio los resultados muestran una modulación distinta dependiendo del tipo de ácido grasos. Por un lado, se observó que los grupos alimentados con AS (7% y 21%) y AC7% mostraron un perfil bajo de expresión de

EDAA en los ratones WT y en los KO PPAR α sucede lo opuesto, hay un incremento en la expresión de HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa. Por otro lado, los grupos KO PPAR α alimentados con AO (7% y 21%) y AC 21% no mostraron cambios en la expresión de EDAA (HAL, SDH y glutaminasa). Es interesante que los grupos KO PPAR α alimentados con AO fueron los que tuvieron niveles casi normales de glucosa y una mayor oxidación de ácidos grasos, suponemos que la normalización en los niveles de glucosa en los grupos KO PPAR α alimentados con AO favorece que no aumenten los niveles de EDAA, se ha reportado que la infusión de glucosa disminuye la excreción de urea (O'Connell et al. 1974). En cambio, la alterada oxidación de ácidos grasos pudiera ser compensada con una alta tasa de utilización de glucosa, inducir una alta concentración de glucagón y la consecuente hipoglucemia. En conjunto estos defectos en el metabolismo favorecieron la expresión de EDAA en los ratones KO PPAR α que consumieron AS y AC (Reichard et al. 1979).

Por otro lado, los ratones WT alimentados con 7 y 21% de AO, o 21% de AC expresan niveles sutiles de HNF4 α , SDH, HAL y glutaminasa (AO7%>AO21%>AC21%), resultados que se pueden deberse a la alta proporción de glucagón/insulina. Mientras que, los ratones WT alimentados con AS al 7% y 21%, al igual que AC al 7% mantienen bajos niveles de expresión de EDAA, incluso el AS 21% reprimió la expresión de SDH .

En particular, en el laboratorio se ha identificado a PPAR α como posible regulador de la degradación de aminoácidos y la conservación del nitrógeno corporal. En los estudios realizados por Alemán *et al.* se observó que la expresión de EDAA se vio disminuida por el efecto del ligando sintético de PPAR α Wy 14643 o por el ácido linoleico (Alemán et al. 2013a). Por otra parte, Contreras *et al.* demostró que en ratones KO PPAR α el aumento en la expresión de EDAA puede deberse a que PPAR α funge como represor de la expresión de EDAA al atenuar la actividad transcripcional de HNF4 α .

En el postprandio los ratones WT alimentados con AO tanto al 7% como al 21% tuvieron los niveles más altos de consumo de O₂, bajos niveles de RER y un mayor porcentaje en la cantidad estimada de ácidos grasos oxidados. Datos que concuerdan con altos niveles de expresión de PPAR α y δ , PGC1 α , ACOX1 y CPT1 α . Acorde con

nuestros datos hay otros reportes en los que también se observa que el consumo de ácido oleico induce una alta expresión de genes que regulan la oxidación de lípidos (Hsu and Huang 2007; Muhlhausler and Ailhaud 2013) o de estimular el desarrollo adipocitos beige o tipo pardo en el tejido adiposo blanco (proceso al que se le denomina “browning”) (Žáčková and Ježek 2002; Shabalina et al. 2004; Vögler et al. 2008; Rodriguez et al. 2002). Después de los grupos WT alimentados con AO tanto al 7% como al 21%, los ratones WT alimentados con AC al 21% también tuvieron una alta expresión de PPAR α y δ , PGC1 α , ACOX1 y CPT1 α ; acompañados de un alto consumo de O₂, un bajo RER y un alto porcentaje en la cantidad estimada de ácidos grasos oxidados, resultados que coinciden con reportes previos (Papamandjaris et al. 1998; Christensen et al. 1989; Shinohara et al. 2005). Después, en orden de expresión de genes implicados en oxidación de ácidos grasos, VO₂ y RER encontramos a los grupos alimentados con AC 7% > AS 21% > AS 7%.

En cuanto a los grupos KO PPAR α , se observó que incluso en la ausencia de PPAR α los ratones alimentados con AO al 7% y 21% fueron los que mantuvieron niveles altos en la expresión de CPT1 α , ACOX1 y PGC1 α , datos que coinciden con un alto consumo de O₂, el RER y el porcentaje de oxidación de ácidos grasos observado. Después del AO los grupos KO PPAR α alimentados con 21% de AC y de AS fueron los que presentaron mayores niveles de oxidación de ácidos grasos. Considerando que estos cambios se llevaron a cabo en ausencia de PPAR α nos preguntamos si estos se debían a la posible sustitución de la función de PPAR α por PPAR δ . PPAR δ es expresado en varios tejidos de manera ubicua y su expresión es detectable desde estadios muy tempranos en la embriogénesis (Braissant et al. 1996). Se ha descrito que PPAR δ es activado por una gran variedad de ligandos como lo son los ácidos grasos de cadena larga, saturados o insaturados (Amri et al. 1995) como el ácido oleico (Yokoi et al. 2010), adicionalmente se ha evidenciado el papel de PPAR δ en el catabolismo de ácidos grasos en varios tejidos (Takahashi et al. 2006; Luquet et al. 2004; Luquet et al. 2005). Entonces, es plausible que PPAR δ pudiera estar ocupando el lugar de PPAR α en la oxidación de ácidos grasos en los ratones KO PPAR α , se observó que esta función compensatoria fue dependiente también del tipo de aceite.

Datos de otros grupos corroboran que PPAR δ suple la función de PPAR α en músculo (Muoio et al. 2002).

Teniendo en cuenta que, si bien los ratones WT que consumieron AS no tuvieron la más alta expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos fueron los que tuvieron los niveles más bajos de síntesis de lípidos. Por ello, nuestros resultados sustentan que la supresión de genes lipogénicos por AGP ($\omega 6$) es principalmente por la inhibición de la expresión de SREBP1 (Tovar et al. 2011; Hyoun-ju Kim et al. 2002). Por otra parte, los ratones WT que consumieron AC fueron los que tuvieron los niveles más altos de expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos SREBP1, PPAR γ , SCD1, ACC y FAS. Dado que el AC está compuesto principalmente por ácidos grasos de cadena media (AGCM), Turner *et al.* 2009 plantea que el AC es más lipogénico ya que el acetil-CoA que se produce por la oxidación de los AGCM (oxidación no dependiente de CPT en la mitocondria) es sustrato para la lipogénesis *de novo* en el hígado (Turner et al. 2009; Geelen et al. 1995). Por otro lado, el patrón de expresión de genes lipogénicos en los ratones WT que consumieron AO fue menor que el de AC. Para terminar, el 21% de grasa de cualquier aceite, disminuye la expresión de genes relacionados con la lipogénesis, un efecto ya reportado por Tovar *et al.* 2011.

De manera semejante al grupo WT, se observó una disminución en la expresión de genes lipogénicos en los ratones KO PPAR α alimentados con 21% de grasa. Por otra parte, los grupos KO PPAR α que mostraron mayor expresión de genes lipogénicos fueron los que consumieron AC y AS al 7%. Adicionalmente, en los ratones KO PPAR α observamos alteraciones en el perfil de lípidos en suero (altos niveles de triglicéridos, LDL y HDL) característicos del modelo KO PPAR α (Akiyama et al. 2001).

Encontramos que los ratones WT que consumieron AC fueron particularmente hipercolesterolémicos, con altos niveles de LDL y HDL, efectos ya reportados previamente (Ahn et al. 1994; Cox et al. 1998; Reiser et al. 1985; Zulet et al. 1999). Si bien se ha considerado que los altos niveles de LDL son un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, recientemente se ha dejado de considerar que los altos niveles de HDL tienen efectos benéficos (Keene et al. 2014) e incluso niveles muy altos de HDL inducidos por la deficiencia del receptor Scavenger B1 se asocian con

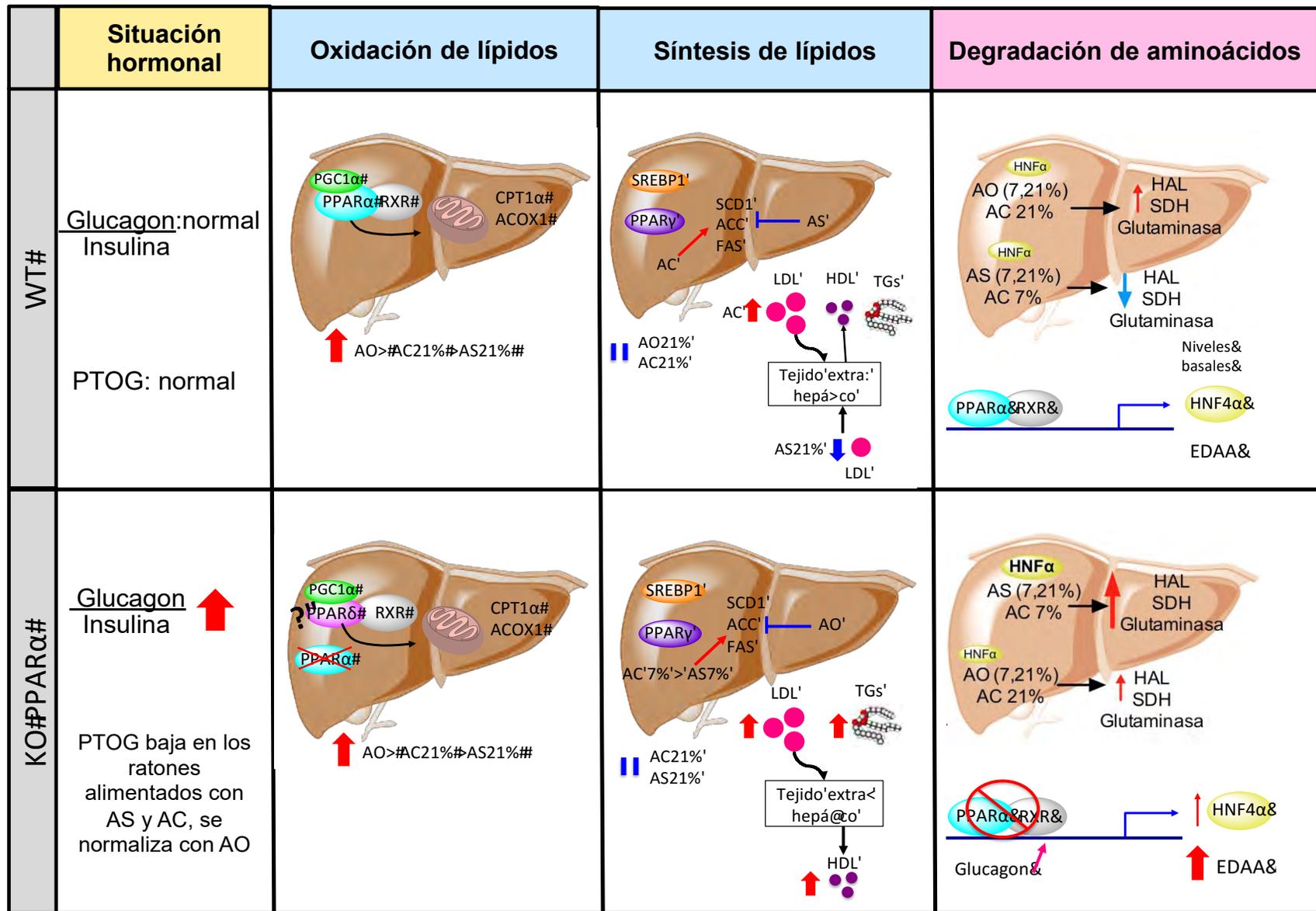
arterosclerosis (Zanoni 2016). Por otra parte, se observó una disminución significativa en los niveles de colesterol LDL en el grupo de AS al 21%, un efecto que ya se encuentra reportado (Deol et al. 2015; Mustad et al. 1996) y que es consistente con los ya establecidos efectos benéficos de los AGP en las enfermedades cardiovasculares (Sanders 2013; T.L.V. et al. 1991) y la recomendación de consumo de ácido linoleico para personas con niveles altos de colesterol (Eckel et al. 2014).

Observamos que la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos es modulada por el tipo y la cantidad de ácidos grasos. Sin embargo, hay resultados que difieren de reportes previos posiblemente porque en los aceites aunque un tipo de ácido graso pueda estar presente a una alta concentración los otros tipos de ácidos grasos pueden aún tener efectos y actividad biológica.

Uno de los cambios más notables en el fenotipo fue en la ganancia de peso corporal, los grupos WT alimentados con AS al 21% tuvieron un aumento significativamente más alto en peso y tejido adiposo blanco (epididimal y retroperitoneal). Estudios previos argumentan que este efecto es debido a que un alto consumo en ácido linoleico ($\omega 6$) favorece la formación de eicosanoides y endocannabinoides (derivados del ácido linoleico) que estimulan el apetito y el consumo de alimento (Anita R. Alvheim et al. 2012; Anita Røyneberg Alvheim et al. 2014; Muhlhausler and Ailhaud 2013). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó un cambio en el consumo calórico con respecto a los demás grupos. Después, aunque el AC está compuesto principalmente por AGS los ratones WT alimentados con este ácido no aumentaron significativamente de peso. Se discute que el AC contiene ácidos grasos de cadena media (ácido laúrico, C12:0) que pueden ser oxidados a una mayor tasa. Así, los ácidos AGCM se transportan a través del torrente sanguíneo por el sistema portal hacia el hígado, lo que los hace menos susceptibles a su deposición en tejido adiposo y a una menor tasa de ganancia de peso (Papamandjaris, Macdougall, and Jones 1998; Ippagunta et al. 2013). Por otro lado, los ratones que fueron alimentados con AO tuvieron una ganancia de peso similar a la del grupo control (AS 7%) aún en los grupos alimentados con 21% de grasa dietaria. Acorde a nuestros resultados hay reportes en humanos y ratas en los que el consumo de AO promueve el mantenimiento del peso corporal e incluso una

disminución del mismo (Vögler et al. 2008; Nimptsch et al. 2010). Para terminar, los ratones KO PPAR α tuvieron menor ganancia de peso corporal comparado con los ratones WT y registraron menor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal, aunque tuvieron mayor tamaño del hígado. De manera semejante hay reportes que indican que el fenotipo de los ratones KO PPAR α no está propiamente asociado con un fenotipo obeso (Akiyama et al. 2001).

En conjunto, nuestros resultados indican la importancia de PPAR α como un interruptor metabólico que modula el uso de sustratos energéticos y la influencia de los ácidos grasos como ligandos y reguladores de PPAR α . Así mismo, se apunta a un papel dual de PPAR α en la regulación del metabolismo de lípidos y del catabolismo de aminoácidos (Figura 18).



AO, aceite oleico; AS, aceite de soya; AC, aceite de coco; PTOG, prueba de tolerancia oral a la glucosa; EDAA, enzimas degradadoras de aminoácidos.

Figura 18. Adaptaciones metabólicas ocurridas en los ratones WT y KO PPARα.

Conclusiones

El PPAR α es un factor de transcripción que puede unirse a ácidos grasos provenientes de la dieta y modular el uso de los sustratos energéticos. En ratones WT se concluye que el consumo de AO estimula en mayor grado la oxidación de ácidos grasos y mantiene niveles bajos de expresión de EDAA, además de una proporción glucagon/insulina más alta que posiblemente este estimulando procesos gluconeogénicos.

Por otro lado, el consumo de AS reduce la expresión de genes involucrados en lipogénesis en hígado y reprimir el catabolismo de aminoácidos; por mecanismos poco claros el consumo de AS al 21% parece estar promoviendo ganancia de peso y aumento del tejido adiposo aunque con una importante reducción en los niveles de LDL.

El consumo de AC parece promover alteraciones en el perfil de lípidos en el suero y una desregulación en el metabolismo hepático de lípidos (alta oxidación y síntesis de ácidos grasos) con un patrón no muy claro en el catabolismo de aminoácidos.

Finalmente, un alto consumo de grasa dietaria independientemente del tipo de aceite (21%) promueve la disminución de la lipogénesis hepática.

Interesantemente, aún en ratones KO PPAR α se observó una alta oxidación de ácidos grasos estimulada por el consumo de AO y de manera semejante aunque en menor grado, los grupos KO PPAR α alimentados con AS o AC también mostraron expresión de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos.

Al no estar PPAR α presente se propone que PPAR δ puede estar ocupando el lugar de PPAR α en la regulación del catabolismo de ácidos grasos.

Adicionalmente, en ratones KO PPAR α también observamos alteraciones en el perfil de lípidos en suero (altos niveles de triglicéridos, LDL y HDL). De igual manera que en los grupos WT el alto consumo de grasa dietaria parece disminuir la lipogénesis hepática.

Aparentemente, las altas concentraciones de glucagon en los ratones KO PPAR α están influyendo en el catabolismo de aminoácidos, sin embargo en ratones KO PPAR α

alimentados con AO no pasa esto, ya que al elevar la concentración de glucosa parece inhibir el aumento en los niveles de expresión de EDAA. Contrario a lo que podría suponerse, el fenotipo de los ratones KO PPAR α parece no estar propiamente asociado con un fenotipo obeso. Finalmente, los resultados presentados enfatizan el papel del PPAR α y los ácidos grasos en la regulación del metabolismo de lípidos y el catabolismo de aminoácidos en hígado contribuyendo a la homeostasis metabólica.

Perspectivas

La evidencia generada en este estudio soporta la importancia de estudiar los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la actividad y funcionalidad de PPAR α en la utilización de los sustratos energéticos. Es por ello que, entre las perspectivas que le suceden a este trabajo están estudiar las repercusiones de las dietas en otros tejidos de importancia metabólica como el músculo, el tejido adiposo pardo y blanco. Por ejemplo, para comprender la participación de los otros tejidos en el aumento del consumo de O₂ que se observó en los ratones alimentados con AO y que resultó en mejores adaptaciones metabólicas incluso en la ausencia de PPAR α . Además, para continuar con el estudio del efecto de los ácidos grasos y de la ausencia de PPAR α sobre el catabolismo de aminoácidos, se plantea hacer cultivos *in vitro* con el ácido laúrico, oleico y linoleico (representativos de los aceites) para precisar la dependencia de los resultados por el tipo de ácido graso y descartar el efecto de los otros ácidos grasos presentes en los aceites. Adicionalmente, convendría inducir la exacerbación del catabolismo de aminoácidos (por una dieta rica en proteína y/o un ayuno prolongado) después de los tratamientos dietarios con los aceites. De esta manera se buscaría acentuar los efectos en la regulación del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos, lo que nos permitiría identificar más fácilmente a otros factores de transcripción que junto con PPAR α están modulando la utilización de sustratos energéticos.

Bibliografía

- Afman, Lydia A., and Michael Müller. 2012. "Human Nutrigenomics of Gene Regulation by Dietary Fatty Acids." *Progress in Lipid Research* 51 (1). Elsevier Ltd: 63–70. doi:10.1016/j.plipres.2011.11.005.
- Ahn, Y.S., D Smith, J Osada, Z Li, E J Schaefer, and J M Ordovas. 1994. "Dietary Fat Saturation Affects Apolipoprotein Gene Expression and High Density Lipoprotein Size Distribution in Golden Syrian Hamsters." *Journal of Nutrition* 124 (11): 2147–55.
- Akiyama, Taro E., Christopher J. Nicol, Catherine Fievet, Bart Staels, Jerrold M. Ward, Johan Auwerx, Susanna S T Lee, Frank J. Gonzalez, and Jeffrey M. Peters. 2001. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Regulates Lipid Homeostasis, but Is Not Associated with Obesity. Studies with Congenic Mouse Lines." *Journal of Biological Chemistry* 276 (42): 39088–93. doi:10.1074/jbc.M107073200.
- Alemán, Gabriela, Victor Ortiz, Alejandra V Contreras, Gabriela Quiroz, Guillermo Ordaz-Nava, Elizabeth Langley, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. 2013a. "Hepatic Amino Acid-Degrading Enzyme Expression Is Downregulated by Natural and Synthetic Ligands of PPAR α in Rats." *The Journal of Nutrition*, no. 13: 1211–18. doi:10.3945/jn.113.176354.aspects.
- . 2013b. "Hepatic Amino Acid-Degrading Enzyme Expression Is Downregulated by Natural and Synthetic Ligands of PPAR α in Rats." *The Journal of Nutrition* 143 (8): 1211–18. doi:10.3945/jn.113.176354.
- Alemán, Gabriela, Nimbe Torres, Héctor Bourges, and Armando R. Tovar. 1998. "Regulation of Histidase Gene Expression by Glucagon, Hydrocortisone and Protein-Free/high Carbohydrate Diet in the Rat." *Life Sciences* 63 (18): 1663–72.
- Alvheim, Anita R., Marian K. Malde, Douglas Osei-Hyiaman, Yu Hong Lin, Robert J. Pawlosky, Lise Madsen, Karsten Kristiansen, Livar Frøyland, and Joseph R. Hibbeln. 2012. "Dietary Linoleic Acid Elevates Endogenous 2-AG and Anandamide and Induces Obesity." *Obesity* 20 (10): 1984–94. doi:10.1038/oby.2012.38.
- Alvheim, Anita Røyneberg, Bente E. Torstensen, Yu Hong Lin, Haldis Haukås

- Lillefosse, Erik Jan Lock, Lise Madsen, Livar Frøyland, Joseph R. Hibbeln, and Marian Kjellefold Malde. 2014. "Dietary Linoleic Acid Elevates the Endocannabinoids 2-AG and Anandamide and Promotes Weight Gain in Mice Fed a Low Fat Diet." *Lipids* 49 (1): 59–69. doi:10.1007/s11745-013-3842-y.
- Amri, E.Z., F. d r. Bonino, G r. Ailhaud, N. A. Abumrad, and P. A. Grimaldi. 1995. "Cloning of a Protein That Mediates Transcriptional Effects of Fatty Acids in Preadipocytes." *Journal of Biological Chemistry* 270 (5): 2367–71. doi:10.1074/jbc.270.5.2367.
- Aoyama, T, J M Peters, N Iritani, T Nakajima, K Furihata, T Hashimoto, and F J Gonzalez. 1998. "Altered Constitutive Expression of Fatty Acid Metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α)." *Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5678–84. doi:10.1074/jbc.273.10.5678.
- Baes, Myriam, and Annelies Peeters. 2010. "Role of PPAR α in Hepatic Carbohydrate Metabolism." *PPAR Research* 2010. doi:10.1155/2010/572405.
- Barger, Philip M., Alyssa C. Browning, Ashley N. Garner, and Daniel P. Kelly. 2001. "p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α : A Potential Role in the Cardiac Metabolic Stress Response." *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44495–501. doi:10.1074/jbc.M105945200.
- Berger, Joel, and David E Moller. 2002. "The Mechanisms of Action of PPARs." *Annual Review of Medicine* 53 (409-35).
- Berger, Joel P., Taro E. Akiyama, and Peter T. Meinke. 2005. "PPARs: Therapeutic Targets for Metabolic Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (5): 244–51. doi:10.1016/j.tips.2005.03.003.
- Blanquart, Christophe, Roxane Mansouri, Réjane Paumelle, Jean-Charles Fruchart, Bart Staels, and Corine Glineur. 2004. "The Protein Kinase C Signaling Pathway Regulates a Molecular Switch between Transactivation and Transrepression Activity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (8): 1906–18. doi:10.1210/me.2003-0327.

- Boyd, R Dean, Dana M Whitehead, and W Ronald Butler. 1985. "Effect of Exogenous Glucagon and Free Fatty Acids on Gluconeogenesis in Fasting Neonatal Pigs." *Journal of Animal Science* 60 (3): 659–65.
- Braissant, O, F Foufelle, C Scotto, M Dauça, and W Wahli. 1996. "Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Tissue Distribution of PPAR-Alpha, -Beta, and -Gamma in the Adult Rat." *Endocrinology* 137 (1): 354–66. doi:10.1210/endo.137.1.8536636.
- Chakravarthy, Manu V., Irfan J. Lodhi, Li Yin, Raghu R V Malapaka, H. Eric Xu, John Turk, and Clay F. Semenkovich. 2009. "Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPAR α in Liver." *Cell* 138 (3). Elsevier Ltd: 476–88. doi:10.1016/j.cell.2009.05.036.
- Chawla, Ajay, and A Lazar. 2014. "Peroxisome Expression In Adipocyte Differentiation Receptor (WAR) Y : And Induction" 643 (February): 798–800.
- Chow, Ching Kuang, ed. 2007. *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, Third Edition Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. Third Edit. CRC Press.
- Christensen, E, T a Hagve, M Grønn, and B O Christophersen. 1989. "Beta-Oxidation of Medium Chain (C8-C14) Fatty Acids Studied in Isolated Liver Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1004 (2): 187–95.
- Clarke, Steven D, Daniela Gasperikova, Carolanne Nelson, Alexandre Lapillonne, and William C Heird. 2002. "Fatty Acid Regulation of Gene Expression." *Annals of the New York Academy of Sciences* 967: 283–98.
- Contreras, Alejandra V, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. 2013. "PPAR α a as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation." *Advances in Nutrition* 4: 439–52. doi:10.3945/an.113.003798.Figure.
- Contreras, Alejandra, Claudia Rangel, Nimbe Torres, Gabriela Alemán, Victor Ortiz, Lilia G Noriega, Omar Granados, et al. 2015. "PPAR α a via HNF4 α a Regulates the Expression of Genes Encoding Hepatic Amino Acid Catabolizing Enzymes to Maintain Metabolic Homeostasis." *Genes & Nutrition* 10 (3): 452. doi:10.1007/s12263-014-0452-0.

- Contreras, Alejandra, Claudia Rangel, Nimbe Torres, Gabriela Alemán, Victor Ortiz, Lilia G. Noriega, Ivan Torre, et al. 2015. "PPAR α via HNF4 α Regulates the Expression of Genes Encoding Hepatic Amino Acid Catabolizing Enzymes to Maintain Metabolic Homeostasis." *Genes and Nutrition* 10 (2): 1–16. doi:10.1007/s12263-014-0452-0.
- Cox, C, W Sutherland, J Mann, S de Jong, A Chisholm, and M Skeaff. 1998. "Effects of Dietary Coconut Oil, Butter and Safflower Oil on Plasma Lipids, Lipoproteins and Lathosterol Levels." *European Journal of Clinical Nutrition* 52 (9): 650–54.
- Cronet, P., J. F W Petersen, R. Folmer, N. Blomberg, K. Sjöblom, U. Karlsson, E. L. Lindstedt, and K. Bamberg. 2001. "Structure of the PPAR α and - γ Ligand Binding Domain in Complex with AZ 242; Ligand Selectivity and Agonist Activation in the PPAR Family." *Structure* 9 (8): 699–706. doi:10.1016/S0969-2126(01)00634-7.
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones. 1986. "Chapter 8." In *Data for Biochemical Research*.
- Deol, Poonamjot, Jane R. Evans, Joseph Dhahbi, Karthikeyani Chellappa, Diana S. Han, Stephen Spindler, and Frances M. Sladek. 2015. "Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver." *PLoS ONE* 10 (7): 1–31. doi:10.1371/journal.pone.0132672.
- Desvergne, B. 1995. "Peroxisome Proliferator Activated Receptors: Transcriptional Regulator of Adipogenesis, Lipid Metabolism and More..." *Chemistry & Biology* 2: 261–66.
- Desvergne, B, and W Wahli. 1999. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism." *Endocrine Reviews* 20 (5): 649–88.
- Di-Po, Nicolas, Nguan Soon Tan, Liliane Michalik, Walter Wahli, and Béatrice Desvergne. 2002. "Antiapoptotic Role of PPAR β in Keratinocytes via Transcriptional Control of the Akt1 Signaling Pathway." *Molecular Cell* 10 (4): 721–33. doi:10.1016/S1097-2765(02)00646-9.
- Dreyer, Christine, Grigorios Krey, Hansjörg Keller, Françoise Givel, Gerd Helftenbein, and Walter Wahli. 1992. "Control of the Peroxisomal - β Oxidation Pathway by a

- Novel Family of Nuclear Hormone Receptors.” *Cell* 68 (5): 879–87. doi:10.1016/0092-8674(92)90031-7.
- Duez, Hélène, Bruno Lefebvre, Philippe Poulain, Inés Pineda Torra, Frédéric Percevault, Gérald Luc, Jeffrey M. Peters, et al. 2005. “Regulation of Human ApoA-I by Gemfibrozil and Fenofibrate through Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulation.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (3): 585–91. doi:10.1161/01.ATV.0000154140.73570.00.
- Eckel, Robert H., John M. Jakicic, Jamy D. Ard, Janet M. De Jesus, Nancy Houston Miller, Van S. Hubbard, I. Min Lee, et al. 2014. “2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk: A Report of the American College of cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.” *Journal of the American College of Cardiology* 63 (25 PART B). Elsevier Ltd: 2960–84. doi:10.1016/j.jacc.2013.11.003.
- Forman, B M, J Chen, and R M Evans. 1997. “Hypolipidemic Drugs, Polyunsaturated Fatty Acids, and Eicosanoids Are Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Delta.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9): 4312–17. doi:10.1073/pnas.94.9.4312.
- Gampe, R T, V G Montana, M H Lambert, a B Miller, R K Bledsoe, M V Milburn, S a Kliewer, T M Willson, and H E Xu. 2000. “Asymmetry in the PPAR γ /RXR α Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization among Nuclear Receptors.” *Molecular Cell* 5 (3): 545–55. doi:10.1016/S1097-2765(00)80448-7.
- Geelen, M J, W J Schoots, C Bijleveld, and a C Beynen. 1995. “Dietary Medium-Chain Fatty Acids Raise and (N-3) Polyunsaturated Fatty Acids Lower Hepatic Triacylglycerol Synthesis in Rats.” *The Journal of Nutrition* 125 (10): 2449–56.
- Georgiadi, Anastasia, and Sander Kersten. 2012. “Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids 1 , 2,” no. 2: 127–34. doi:10.3945/an.111.001602.factors.
- Goto, Tsuyoshi, Nobuyuki Takahashi, Sota Kato, Kahori Egawa, Shogo Ebisu, Tatsuya Moriyama, Tohru Fushiki, and Teruo Kawada. 2005. “Phytol Directly Activates

- Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha) and Regulates Gene Expression Involved in Lipid Metabolism in PPARalpha-Expressing HepG2 Hepatocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (2): 440–45. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.077.
- Guerre-Millo, M., C. Rouault, P. Poulain, J. André, V. Poitout, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, J. C. Fruchart, G. Reach, and B. Staels. 2001. "PPAR-Alpha-Null Mice Are Protected from High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance." *Diabetes* 50 (3): 2809–14.
- Horváth, G, Á Bencsura, Á Simon, GP Tochtrop, GT DeKoster, DF Covey, DP Cistola, and O Toke. 2016. "Structural Determinants of Ligand Binding in the Ternary Complex of Human Ileal Bile Acid Binding Protein with Glycocholate and Glycochenodeoxycholate Obtained from Solution NMR." *The FEBS Journal* 283 (3): 541–55.
- Hsu, Shan Ching, and Ching jang Huang. 2007. "Changes in Liver PPAR α mRNA Expression in Response to Two Levels of High-Safflower-Oil Diets Correlate with Changes in Adiposity and Serum Leptin in Rats and Mice." *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (2): 86–96. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.03.003.
- Imai, Takeshi, Reiko Takakuwa, Sandra Marchand, Emilie Dentz, Jean-marc Bornert, Nadia Messaddeq, Walter Wahli, et al. 2004. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Is Required in Mature White and Brown Adipocytes for Their Survival in the Mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13): 4543–47. doi:10.1073/pnas.0400356101.
- Ippagunta, S, Z Angius, M Sanda, and K M Barnes. 2013. "Dietary CLA-Induced Lipolysis Is Delayed in Soy Oil-Fed Mice Compared to Coconut Oil-Fed Mice." *Lipids* 48 (11): 1145–55. doi:10.1007/s11745-013-3835-x.
- Jeffs, S G. 1969. "Basic Concepts of Human Nutrition." *The Journal of the Royal College of General Practitioners* 18 (86): 173–79.
- Juge-Aubry, C.E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, a. Pernin, a. Takeshita, W.W. Chin, a.G. Burger, and C.a. Meier. 1999. "Regulation of the Transcriptional Activity of the

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by Phosphorylation of a Ligand-Independent Trans-Activating Domain.” *J Biol Chem* 274 (15): 10505–10. doi:10.1074/jbc.274.15.10505.

Juge-aubry, Cristiana, Tatiana Favez, Albert G Burger, Walter Wahli, and Christophe A Meier. 1997. “DNA Binding Properties of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtypes on Various Natural Peroxisome Proliferator” 272 (40): 25252–59.

Jump, Donald B, and Steven D Clarke. 1999. “Regulation of Gene Expression by Dietary Fat.” *Annual Review of Nutrition* 19: 63–90.

Keene, Daniel, Clare Price, Matthew J Shun-Shin, and Darrel P Francis. 2014. “Effect on Cardiovascular Risk of High Density Lipoprotein Targeted Drug Treatments Niacin, Fibrates, and CETP Inhibitors: Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials Including 117,411 Patients.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 349 (jul18_2): g4379. doi:10.1136/bmj.g4379.

Kersten, S, B Desvergne, and W Wahli. 2000. “Roles of PPARs in Health and Disease.” *Nature* 405 (6785): 421–24. doi:10.1038/35013000.

Kersten, S, S Mandard, P Escher, F J Gonzalez, S Tafuri, B Desvergne, and W Wahli. 2001a. “The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Regulates Amino Acid Metabolism.” *Faseb J* 15: 1971–78. doi:10.1096/fj.01-0147com.

———. 2001b. “The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Regulates Amino Acid Metabolism.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (11): 1971–78. doi:10.1096/fj.01-0147com.

Kersten, Sander, Josiane Seydoux, Jeffrey M Peters, Frank J Gonzalez, Beatrice Desvergne, and Walter Wahli. 1999. “Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Mediates the Adaptive Response to Fasting.” *J. Clin. Invest.* 103 (11): 1489–98.

Kim, H., M. Haluzik, Z. Asghar, D. Yau, J.W. Joseph, a.M. Fernandez, M.L. Reitman, et al. 2003. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist Treatment in a Transgenic Model of Type 2 Diabetes Reverses the Lipotoxic State and Improves

Glucose Homeostasis." *Diabetes* 52 (7): 1770–78.

Kim, Hyoun-ju, Makoto Miyazaki, Weng C H I Man, and James M Ntambi. 2002. "Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs) as Regulators of Lipid Metabolism Polyunsaturated Fatty Acids Oppose Cholesterol- Mediated Induction of SREBP-1 Maturation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 967: 34–42.

Kliwer, S a, K Umesono, D J Noonan, R a Heyman, and R M Evans. 1992. "Convergence of 9-Cis Retinoic Acid and Peroxisome Proliferator Signalling Pathways through Heterodimer Formation of Their Receptors." *Nature* 358 (6389): 771–74. doi:10.1038/358771a0.

Koutnikova, Hana, Terrie-Anne Cock, Mitsuhiro Watanabe, Sander M Houten, Marie-France Champy, André Dierich, and Johan Auwerx. 2003. "Compensation by the Muscle Limits the Metabolic Consequences of Lipodystrophy in PPAR Gamma Hypomorphic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (24): 14457–62. doi:10.1073/pnas.2336090100.

Krey, G, O Braissant, F L'Horset, E Kalkhoven, M Perroud, M G Parker, and W Wahli. 1997. "Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (6): 779–91. doi:10.1210/mend.11.6.0007.

Laudet, Vincent, Johan Auwerx, Jan- Ake Gustafsson, and Walter Wahli. 1999. "A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily." *Cell* 97 (100): 161–63. doi:S0092-8674(00)80726-6 [pii].

Lee, S S, T Pineau, J Drago, E J Lee, J W Owens, D L Kroetz, P M Fernandez-Salguero, H Westphal, and F J Gonzalez. 1995. "Targeted Disruption of the Alpha Isoform of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene in Mice Results in Abolishment of the Pleiotropic Effects of Peroxisome Proliferators." *Molecular and Cellular Biology* 15: 3012–22.

Lefebvre, Philippe, Giulia Chinetti, Jean Charles Fruchart, and Bart Staels. 2006.

- “Sorting out the Roles of PPAR α in Energy Metabolism and Vascular Homeostasis.” *Journal of Clinical Investigation* 116 (3): 571–80. doi:10.1172/JCI27989.
- Lin, Q, S E Ruuska, N S Shaw, D Dong, and N Noy. 1999. “Ligand Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha.” *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* 38 (1): 185–90. doi:10.1021/bi9816094.
- Luquet, Serge, Celine Gaudel, Dorte Holst, Joaquin Lopez-Soriano, Chantal Jehl-Pietri, Alexandre Fredenrich, and Paul a Grimaldi. 2005. “Roles of PPAR Delta in Lipid Absorption and Metabolism: A New Target for the Treatment of Type 2 Diabetes.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1740 (2): 313–17. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.011.
- Luquet, Serge, Joaquin Lopez-Soriano, Dorte Holst, Céline Gaudel, Chantal Jehl-Pietri, Alexandre Fredenrich, and Paul André Grimaldi. 2004. “Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta (PPAR δ) in the Control of Fatty Acid Catabolism. A New Target for the Treatment of Metabolic Syndrome.” *Biochimie* 86 (11): 833–37. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.024.
- Lusk, Graham. 1968. *The Elements of the Science of Nutrition*. W. B. Saunders Company.
- Maloney, E.K., and D.J. Waxman. 1999. “Trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by Structurally Diverse Environmental Chemicals.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 161 (2): 209–18. doi:10.1006/taap.1999.8809.
- Mandard, S., M. Müller, and S. Kersten. 2004. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Target Genes.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (4): 393–416. doi:10.1007/s00018-003-3216-3.
- Michalik, L., and W. Wahli. 2006. “Involvement of PPAR Nuclear Receptors in Tissue Injury and Wound Repair.” *J Clin Invest* 116 (3): 598–606. doi:10.1172/JCI27958.
- Michalik, Liliane, Johan Auwerx, Joel P Berger, V Krishna Chatterjee, Christopher K Glass, Frank J Gonzalez, Paul a Grimaldi, et al. 2006. “International Union of

- Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *Pharmacol. Rev.* 58 (4): 726–41. doi:10.1124/pr.58.4.5.(NR1C1).
- Muhlhauser, Beverly S, and Gérard P Ailhaud. 2013. "Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids and the Early Origins of Obesity." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 20 (1): 56–61. doi:10.1097/MED.0b013e32835c1ba7.
- Muoio, Deborah M., Paul S. MacLean, David B. Lang, Shi Li, Joseph A. Houmard, James M. Way, Deborah A. Winegar, J. Christopher Corton, G. Lynis Dohm, and William E. Kraus. 2002. "Fatty Acid Homeostasis and Induction of Lipid Regulatory Genes in Skeletal Muscles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α Knock-out Mice. Evidence for Compensatory Regulation by PPAR α ." *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26089–97. doi:10.1074/jbc.M203997200.
- Mustad, V a, J L Ellsworth, a D Cooper, P M Kris-Etherton, and T D Etherton. 1996. "Dietary Linoleic Acid Increases and Palmitic Acid Decreases Hepatic LDL Receptor Protein and mRNA Abundance in Young Pigs." *J Lipid Res.* 37 (11): 2310–23.
- Nadra, K, S I Anghel, E Joye, N S Tan, S Basu-Modak, D Trono, W Wahli, and B Desvergne. 2006. "Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/delta." *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 3266–81. doi:10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006.
- Nagy, Laszlo, and John W R Schwabe. 2004. "Mechanism of the Nuclear Receptor Molecular Switch." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (6): 317–24. doi:10.1016/j.tibs.2004.04.006.
- Narala, Venkata R., Ravi K. Adapala, Madathilparambil V. Suresh, Thomas G. Brock, Marc Peters-Golden, and Raju C. Reddy. 2010. "Leukotriene B4 Is a Physiologically Relevant Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist." *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22067–74. doi:10.1074/jbc.M109.085118.
- Nimptsch, Katharina, Gabriele Berg-Beckhoff, and Jakob Linseisen. 2010. "Effect of

- Dietary Fatty Acid Intake on Prospective Weight Change in the Heidelberg Cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *Public Health Nutrition* 13 (10): 1636–46. doi:10.1017/S1368980009993041.
- O'Connell, R. C., A. P. Morgan, T. T. Aoki, M. R. Ball, and F. D. Moore. 1974. "Nitrogen Conservation in Starvation: Graded Responses to Intravenous Glucose." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 39 (3): 555–63. doi:10.1210/jcem-39-3-555.
- Oakes, Nicholas D., Gregory J. Cooney, Souad Camilleri, Donald J. Chisholm, and Edward W. Kraegen. 1997. "Mechanisms of Liver and Muscle Insulin Resistance Induced by Chronic High-Fat Feeding." *Diabetes* 46 (11): 1768–74. doi:10.2337/diab.46.11.1768.
- Papamandjaris, Andrea a., Diane E. Macdougall, and Peter J.H. Jones. 1998. "Medium Chain Fatty Acid Metabolism and Energy Expenditure: Obesity Treatment Implications." *Life Sciences* 62 (14): 1203–15. doi:10.1016/S0024-3205(97)01143-0.
- Reeves, P G, F H Nielsen, and G C Fahey. 1993. "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet." *The Journal of Nutrition* 123 (11): 1939–51.
- Reichard, G. A., A. C. Haff, C. L. Skutches, P. Paul, C. P. Holroyde, and O. E. Owen. 1979. "Plasma Acetone Metabolism in the Fasting Human." *Journal of Clinical Investigation* 63 (4): 619–26. doi:10.1172/JCI109344.
- Reiser, Raymond, Abraham Silvers, LW Scott, ML Shornew, RD Wood, Barbara C'O'Brien, AM Gotto, D Phil, and William Insull. 1985. "Plasma to Beef Lipid and Lipoprotein Response Fat , Coconut Oil and Safflower." *The American Journal of Clinical Nutrition*, no. August: 190–97.
- Rodríguez-Cruz, Maricela, Armando R Tovar, Martha Prado, and Nimbe Torres. 2005. "Mecanismos Moleculares de Acción de Los Ácidos Grasos Poliinsaturados Y Sus Beneficios En La Salud." *Revista de Ingestigación Clínica* 57 (3): 457–72.
- Rodriguez, V M, M P Portillo, C Pico, M T Macarulla, and A Palou. 2002. "Olive Oil

- Feeding up-Regulates Uncoupling Protein Genes in Rat Brown Adipose Tissue and Skeletal Muscle 1 – 3.” *American Journal of Clinical Nutrition*, 1–8.
- Sampath, Harini, and James M. Ntambi. 2005. “Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism.” *Annual Review of Nutrition* 25 (1): 317–40. doi:10.1146/annurev.nutr.25.051804.101917.
- Sanders, Thomas a B. 2013. “Protective Effects of Dietary PUFA against Chronic Disease: Evidence from Epidemiological Studies and Intervention Trials.” *The Proceedings of the Nutrition Society* 44 (March 2013): 1–7. doi:10.1017/S0029665113003789.
- Sato, Kazusa, Hidekazu Arai, Akira Mizuno, Makiko Fukaya, Tadatoshi Sato, Megumi Koganei, Hajime Sasaki, et al. 2007. “Dietary Palatinose and Oleic Acid Ameliorate Disorders of Glucose and Lipid Metabolism in Zucker Fatty Rats.” *The Journal of Nutrition* 137 (8): 1908–15.
- Savage, David B, Garry D Tan, Carlo L Acerini, Susan A Jebb, Maura Agostini, Mark Gurnell, Rachel L Williams, et al. 2003. “Dominant-Negative Mutations in the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ .” *Diabetes* 52 (April): 910–19.
- Semple, Robert K, V Krishna K Chatterjee, and Stephen O Rahilly. 2006. “Review Series PPAR γ and Human Metabolic Disease.” *Journal of Clinical Investigation* 116 (3): 581–89. doi:10.1172/JCI28003.taglandin.
- Shabalina, Irina G., Anders Jacobsson, Barbara Cannon, and Jan Nedergaard. 2004. “Native UCP1 Displays Simple Competitive Kinetics between the Regulators Purine Nucleotides and Fatty Acids.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (37): 38236–48. doi:10.1074/jbc.M402375200.
- Shinohara, Hisami, Akiko Ogawa, Michio Kasai, and Toshiaki Aoyama. 2005. “Effect of Randomly Interesterified Triacylglycerols Containing Medium- and Long-Chain Fatty Acids on Energy Expenditure and Hepatic Fatty Acid Metabolism in Rats.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (10): 1811–18. doi:10.1271/bbb.69.1811.

- Staels, B, W Koenig, A Habib, R Merval, M Lebret, I P Torra, P Delerive, et al. 1998. "Activation of Human Aortic Smooth-Muscle Cells Is Inhibited by PPAR α but not PPAR γ Activators." *Nature* 303 (6687): 790.
- Stanley, Thomas B., Lisa M. Leesnitzer, Valerie G. Montana, Cristin M. Galardi, Millard H. Lambert, Jason A. Holt, H. Eric Xu, Linda B. Moore, Steven G. Blanchard, and Julie B. Stimme. 2003. "Subtype Specific Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands on Corepressor Affinity." *Biochemistry* 42 (31): 9278–87. doi:10.1021/bi034472c.
- Surapureddi, Sailesh, Songtao Yu, Hengfu Bu, Takashi Hashimoto, Anjana V Yeldandi, Papreddy Kashireddy, Mustapha Cherkaoui-Malki, et al. 2002. "Identification of a Transcriptionally Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha - Interacting Cofactor Complex in Rat Liver and Characterization of PRIC285 as a Coactivator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11836–41. doi:10.1073/pnas.182426699.
- T.L.V., Ulbricht, Southgate D.A.T., T.L.V. Ulbricht, and D.a.T. Southgate. 1991. "Coronary Heart Disease: Seven Dietary Factors." *The Lancet* 338 (8773): 985–92. doi:10.1016/0140-6736(91)91846-M.
- Takahashi, Sadao, Toshiya Tanaka, Tatsuhiko Kodama, and Juro Sakai. 2006. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta (PPAR Delta), a Novel Target Site for Drug Discovery in Metabolic Syndrome." *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 53 (6): 501–7. doi:10.1016/j.phrs.2006.03.019.
- Tovar, Armando R, Andrea Díaz-Villaseñor, Natally Cruz-Salazar, Guillermo Ordáz, Omar Granados, Berenice Palacios-González, Claudia Tovar-Palacio, Patricia López, and Nimbe Torres. 2011. "Dietary Type and Amount of Fat Modulate Lipid Metabolism Gene Expression in Liver and in Adipose Tissue in High-Fat Diet-Fed Rats." *Archives of Medical Research* 42 (6): 540–53. doi:10.1016/j.arcmed.2011.10.004.
- Turner, Nigel, Krit Hariharan, Jennifer TidAng, Georgia Frangioudakis, Susan M Beale,

- Lauren E Wright, Xiao Yi Zeng, et al. 2009. "Enhancement of Muscle Mitochondrial Oxidative Capacity and Alterations in Insulin Action Are Lipid Species Dependent: Potent Tissue-Specific Effects of Medium-Chain Fatty Acids." *Diabetes* 58 (11): 2547–54. doi:10.2337/db09-0784.
- Varnat, Frédéric, B. B. Heggeler, Philippe Grisel, Nathalie Boucard, Irène Corthésy-Theulaz, Walter Wahli, and Béatrice Desvergne. 2006. "PPAR β/δ Regulates Paneth Cell Differentiation Via Controlling the Hedgehog Signaling Pathway." *Gastroenterology* 131 (2): 538–53. doi:10.1053/j.gastro.2006.05.004.
- Vögler, O, a López-Bellan, R Alemany, S Tofé, M González, J Quevedo, V Pereg, F Barceló, and P V Escriba. 2008. "Structure-Effect Relation of C18 Long-Chain Fatty Acids in the Reduction of Body Weight in Rats." *International Journal of Obesity (2005)* 32 (3): 464–73. doi:10.1038/sj.ijo.0803768.
- Wang, Yong Xu, Chih Hao Lee, Sambath Tiep, Ruth T. Yu, Jungyeob Ham, Heonjoong Kang, and Ronald M. Evans. 2003. "Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity." *Cell* 113 (2): 159–70. doi:10.1016/S0092-8674(03)00269-1.
- Williamson, J. R., E. T. Browning, R. Scholz, R. A. Kreisberg, and I. B. Fritz. 1968. "Inhibition of Fatty Acid Stimulation of Gluconeogenesis by (+)-Decanoylcarnitine in Perfused Rat Liver." *Diabetes* 17 (4): 194–208. doi:10.2337/diab.17.4.194.
- Yokoi, Hiroshi, Hajime Mizukami, Akito Nagatsu, Hiroki Tanabe, and Makoto Inoue. 2010. "Hydroxy Monounsaturated Fatty Acids as Agonists for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *Biological {&} Pharmaceutical Bulletin* 33 (5): 854–61. doi:10.1248/bpb.33.854.
- Yu, Songtao, and Janardan K. Reddy. 2007. "Transcription Coactivators for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771 (8): 936–51. doi:10.1016/j.bbalip.2007.01.008.
- Žáčková, Markéta, and Petr Ježek. 2002. "Reconstitution of Novel Mitochondrial Uncoupling Proteins UCP2 and UCP3." *Bioscience Reports* 22 (1): 33–46. doi:10.1023/A:1016009022186.

- Zanoni, Paolo. 2016. "Rare Variant in Scavenger Receptor BI Raises HDL Cholesterol and Increases Risk of Coronary Heart Disease." *Science* 351 (6278): 1166–71. doi:10.1126/science.aad3517.
- Zhu, Y, C Qi, J R Korenberg, X N Chen, D Noya, M S Rao, and J K Reddy. 1995. "Structural Organization of Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (mPPAR Gamma) Gene: Alternative Promoter Use and Different Splicing Yield Two mPPAR Gamma Isoforms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17): 7921–25. doi:10.1073/pnas.92.17.7921.
- Zulet, M a, A Barber, H Garcin, P Higuieret, and J a Martínez. 1999. "Alterations in Carbohydrate and Lipid Metabolism Induced by a Diet Rich in Coconut Oil and Cholesterol in a Rat Model." *Journal of the American College of Nutrition* 18 (1): 36–42. doi:10.1080/07315724.1999.10718825.