



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud.

“Análisis de silenciamiento génico bajo el mecanismo de metilación en la región promotora de los genes TLR 2, 4, 9 y expresión de miRNAs específicos en leucocitos de pacientes con sobrepeso, obesidad grado I y II bajo tratamiento de dieta y ejercicio”.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS.

P R E S E N T A:

M. C. S. ALEJANDRO GÓMEZ ALCALÁ

Tutor: Dr. Aarón Domínguez López
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Enero del 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Hace años me parecía ABSOLUTAMENTE IMPOSIBLE siquiera poder acceder a cursar un doctorado, con el paso de los años me di poco a poco cuenta que podía hacerlo y empecé el largo y complicado camino hacia esa meta.

Primero que nada quiero agradecer a todos los que NO creían que yo pudiera entrar a un doctorado porque gracias a ellos me di cuenta que la dedicación, la reflexión, el estudio y sobre todo la paciencia son el camino para lograrlo todo.

La persona que más me ha apoyado a lo largo de mi camino en la ciencia es sin lugar a dudas el Dr. Aarón Domínguez López, él creyó en mí y me ayudó a que yo mismo creyera en mí; agradezco su paciencia, calidad humana, disciplina, consejos, largas charlas y sobre todo por su amistad. Es una persona muy valiosa de quien he aprendido bastante.

Agradezco el apoyo del Dr. Ángel Miliar García ya que sin su incalculable apoyo con las instalaciones e insumos obtenidos en el Laboratorio de Biología Molecular de la unidad del posgrado en la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) me hubiese sido absolutamente imposible llevar a fin este proyecto Doctoral.

Otra persona muy importante que me apoyó bastante con su alegría, amistad así como con el seguimiento de los pacientes fue el M.C.S. Aldo Alex Ahumada, gracias a él y a todo el personal del Stars Club este trabajo salió adelante.

Es muy importante agradecer el apoyo a los que fueron mis “alumnos” durante este proyecto y que me apoyaron con múltiples tareas a lo largo de este proyecto: Itzelt Hernández, Marisol Orihuela, Perlan Arenas Márquez y Valeria Fuentes.

Un Médico del deporte que me ayudó en el desarrollo y diseño del programa de ejercicio y la prueba de esfuerzo fue Romeo Alegría, no puedo dejar de agradecerle por su valioso apoyo.

En de la recta final del escrito de esta tesis hubo dos personas que me apoyaron mucho en cuanto a redacción y corrección de estilo, les agradezco además por ser grandes amigas y apoyarme en momentos complicados; me refiero a la M. en C. Ariadna Natalia Cevantes Nevárez y a la Lic. Aleithia Manzanarez Villegas quien además me apoyó y me orientó incesantemente en cuanto a toda la tramitología que se requirió durante todo el tiempo que duró el doctorado.

La gente que me tutoró, corrigió, regañó, ilustró, escucho e instruyó en este posgrado perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por parte de la Facultad de Química; sin lugar a dudas fue la más exigente y fuerte formadora de mi calidad profesional, académica y sin lugar a dudas personal por lo que de mi parte tendrán SIEMPRE mi más sincero reconocimiento y agradecimiento; me refiero particularmente a la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta y por supuesto a la Dra. Katy A. Sánchez Pozos.

Un punto medular de los agradecimientos esta en reconocer el apoyo colosal que recibí de parte de el comité tutor que evaluó cada semestre con mucho interés y llenos de observaciones los avances de este trabajo. Todas y cada una de las sugerencias fueron poco a poco modificando, orientando y por supuesto transformando a fondo este trabajo doctoral. En orden alfabético quiero externar mi más sentido agradecimiento y admiración a mi tutor el Dr. Aarón Domínguez López y los doctores David Cruz Robles; Jorge Escobedo de la Peña; Juan Pablo Méndez Blanco y sin lugar a dudas a la doctora Marta Alicia Menjívar Iraheta siendo ella la piedra angular de muchos de los sucesos para que este doctorado tuviera éxito como profesora, tutora dentro del comité tutorial y por supuesto coordinadora del Posgrado en Bioquímica Clínica.

En el doctorado existieron dos momentos absolutamente cruciales que debí superar para poder obtener el grado. Me refiero al examen de Candidatura a Doctor y por supuesto al examen de grado, en ambos eventos conté con el apoyo, supervisión, observaciones, y soporte de un grupo de especialistas en varios temas relacionados con mi trabajo. Quiero agradecer enormemente al grupo de especialistas que formaron parte del jurado que evaluó ambos exámenes: el Dr. Aarón Domínguez López, el Dr. Fausto Sanchez Muñoz, la Dra. Huang Fengyang, la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, el Dr. Juan Pablo Méndez Blanco y la Dra. María Elizabeth Tejero Barrera.

Toda la gente que me poyo para que este trabajo tuviera éxito han sido extremadamente valiosas; sin embargo hubo tres personas que me apoyaron de manera inmejorable en cuanto a experimentación, técnicas, análisis y resultados. Sin su apoyo este trabajo simplemente jamás hubiera podido ser realizado y mucho menos concluir. Quiero agradecer a la Dra. Paóla Zárate y a el Dr. Edgar Enrique Sevilla Reyes que me apoyaron con la secuenciación de los genes TLR2 y TLR4; quiero agradecer por otra parte al Dr. Fausto Sanchez Muñoz el cual además de siempre ofrecerme su valiosa amistad me dio asesoría, enseñanza y apoyo para realizar la tipificación de miRNAs asociados al silenciamiento de los TLRs.

Los agradecimientos siempre son muchos; primero quise citar a las personas que me apoyaron profesionalmente en el desarrollo del trabajo. Un doctorado más allá de ser solo un trabajo académico es un estilo de vida que te lleva a perder amistades, ganar amistades y por supuesto afianzar lazos con las personas importantes. Quiero agradecer a mis papás que, a pesar de no entender del todo la relevancia del trabajo, si reconocieron a cabalidad la importancia del mismo y lo colosal y relevante que es realizar un doctorado; quiero decirles gracias por sus frecuentes preguntas: de ¿cómo vas?, ¿todo está en orden?, y su interés por escuchar los pormayores y pormenores de mi trabajo para darme siempre una palabra de aliento.

Finalmente; a lo largo de estos años conocí una persona que ha marcado mi vida de manera importante, cuando fuimos pareja me apoyo en lo que pudo y, a pesar de su corta edad, con su alegría, naturalidad y hermosa sonrisa siempre me dio momentos de alegría, felicidad e incluso mucho amor.... GRACIAS PERLA CRUZ MERINO... por haber estado cerca de mí a pesar de nuestros momentos duros y sinsabores; e incluso a pesar de que decidimos recorrer distintos caminos nunca pasaré por alto tu compañía y apoyo.

¡¡¡GRACIAS NUEVAMENTE A TODOS Y CADA UNO DE USTEDES!!!

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Silenciamiento génico	3
• Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS).....	4
I. RNAs pequeños nucleares (snRNA).....	4
II. RNAs largos no codificantes (lncRNAs).....	5
III. RNAs pequeños interferentes (siRNAs).....	5
IV. Micro RNAs (miRNAs).....	7
• Silenciamiento Génico Transcripcional (TGS); mecanismos epigenéticos de regulación génica.....	9
I. Metilación de DNA en regiones de promotor.....	9
a. Metilación de Mantenimiento.....	11
b. Metilación <i>de novo</i>	12
II. Modificación de histonas.....	12
Obesidad	13
• Epidemiología del sobrepeso y la obesidad; problemática del sobrepeso y la obesidad en el mundo y en México.....	15
• Clasificación de obesidad de acuerdo al exceso de peso corporal.....	17
I. Tablas de peso y talla	18
II. Índices.....	18

	Pag.
<ul style="list-style-type: none"> • Clasificación de la obesidad según el Índice de Masa Corporal (IMC) según la OMS..... 	19
<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones metabólicas asociadas al desarrollo del sobrepeso y la obesidad..... 	21
El ejercicio y una dieta balanceada como tratamiento del sobrepeso y la obesidad.....	24
Ejercicio físico.....	24
<ul style="list-style-type: none"> • Ejercicio aeróbico..... • Ejercicio físico y su relación con el sobrepeso y la obesidad..... • Efectos del ejercicio sobre el perfil bioquímico de salud cardiovascular..... • Programas de entrenamiento como tratamiento a la obesidad..... • Prueba de esfuerzo..... • Protocolos de entrenamiento..... 	24 26 27 28 29 30
Dieta.....	32
<ul style="list-style-type: none"> • Dietoterapia aplicable en condiciones de sobrepeso y obesidad..... 	32
¿Cómo se integran al tratamiento de la obesidad los receptores?.....	33
Los receptores tipo Toll (TLRs).....	34
<ul style="list-style-type: none"> • Proceso de interacción de los TLRs con los patógenos..... • Señalización MyD dependiente y MyD independiente post activación de los TLRs..... • Ubicación cromosómica de la familia de los genes TLR 's..... • Relación del sobrepeso y la obesidad con los genes TLR2, TLR4 y TLR9..... 	41 43 46 47
Metilación en la región del promotor de los genes.....	49
<ul style="list-style-type: none"> • Metilación en la región del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9..... 	49
miRNAs asociados al silenciamiento de TLR2, TLR4 y TLR9.....	49

	Pag.
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	52
OBJETIVO	53
• Objetivos Secundarios.....	53
METODOLOGÍA	53
• Tipo de estudio.....	53
• Muestra.....	53
• Invitación a los pacientes al programa.....	54
• Criterio de selección de las pacientes.....	54
○ Criterios de inclusión.....	54
○ Criterios de exclusión.....	55
○ Criterios de eliminación.....	55
• Firma del consentimiento informado.....	55
• Grupo de estudio.....	55
• Tratamiento nutricional.....	56
○ Consultas nutricionales.....	56
○ Historia clínica.....	57
○ Distribución y composición de la dieta.....	57
• Evaluación antropométrica en los pacientes.....	58
• Prueba de esfuerzo.....	58
• Programa de ejercicio físico aeróbico moderado en pacientes.....	59
• Técnicas y procedimientos.....	60
○ Toma de muestras séricas y sanguíneas.....	60
○ Determinación del perfil metabólico.....	61
○ Extracción de RNA y DNA.....	62
○ Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.....	62
○ Estudios de silenciamiento.....	62
I. Caracterización de metilación en sitios CpG de regiones promotoras de los genes TLR2, TLR4 y TLR9.....	63
II. Caracterización de miRNAs asociados al silenciamiento de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 (miR-21, miR-146a, miR-33a, miR-155 y miR-223).....	65
○ Estudios de expresión génica de los genes TLR2, TLR4 y TLR9.....	66
○ Procesamiento estadístico.....	67

	Pag.
RESULTADOS	68
Análisis estadístico	70
I. Resultado de los parámetros antropométricos.....	72
II. Resultados de los parámetros bioquímicos.....	74
III. Resultados de expresión génica.....	76
IV. Resultados de metilación.....	83
V. Análisis de secuenciación.....	86
○ Secuenciación de la región del promotor de TLR2 transformada por bisulfito sódico (no nativa).....	86
○ Secuenciación de la región del promotor de TLR4 transformada por bisulfito sódico (no nativa).....	91
VI. Factores transcripcionales asociados a TLR2.....	94
VII. Factores transcripcionales asociados a TLR4.....	96
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	98
i. Análisis de resultados antropométricos, bioquímicos y de expresión génica..	98
ii. Análisis de miRNAs asociados a TLR2, TLR4 y TLR9.....	100
iii. Análisis de Metilación del fragmento de la región promotora de TLR2.....	102
iv. Análisis de Metilación del fragmento de la región promotora de TLR4.....	103
LITERATURA CONSULTADA	107
LITERATURA CITADA EN LA DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	116
ABREVIATURAS	118
ANEXOS	120

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por una acumulación excesiva de grasa acompañada por una inflamación crónica moderada (metainflamación). México ocupa el segundo lugar de obesidad a nivel mundial en adultos, por lo que es crucial realizar estudios de obesidad en este país para describir, entender y combatir esta enfermedad. La dieta en conjunto con el ejercicio aeróbico moderado es el mejor tratamiento no farmacológico efectivo para combatir la obesidad. Evidencia reciente señala que la metainflamación la cual es un componente importante en el desarrollo de la obesidad está regulada por la acción de algunos Receptores Tipo Toll (TLRs); particularmente por TLR2, TLR4 y TLR9; recientemente se comenzó a estudiar y describir como los estímulos de dieta y ejercicio provocan cambios de metilación en la región promotora de los genes TLRs desencadenando silenciamiento génico traducido en subexpresión génica. Se conoce que algunos miRNAs regulan la expresión de los TLRs. Los cambios de expresión de miRNAs también se han asociado a estímulos de dieta y/o ejercicio. Con la finalidad de conocer con mayor detalle la relación: metilación – TLRs – dieta y ejercicio así como la interacción: miRNAs – TLRs – dieta y ejercicio; se diseñó un programa de dieta hipocalórica y ejercicio aeróbico moderado; el cual se aplicó a 16 personas de 30 a 40 años con sobrepeso, obesidad grado I y obesidad grado II sin comorbilidades asociadas. A partir de las muestras obtenidas de los pacientes se caracterizó el grado de metilación de la región mínima del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9; además se estudió la expresión génica de TLR2, 4, 9 y finalmente la expresión génica de cinco miRNAs asociados al silenciamiento de los TLRs estudiados (a nivel sérico y celular).

Los resultados antropométricos mostraron una disminución importante de las medidas iniciales; los resultados bioquímicos mostraron esa misma tendencia; todo lo anterior como respuesta al programa de dieta y ejercicio. En cuanto a expresión de TLR2 y 4 se observó una disminución de expresión génica con una $p= 0.012$ y 0.047 respectivamente; la expresión génica de los miRNAs asociados a silenciamiento de los TLRs aumentó significativamente y finalmente la intervención de dieta y ejercicio resultó en el incremento del grado de metilación de 15.4% en TLR2 y de 10% en TLR4.

Palabras clave:

Obesidad, inflamación crónica moderada, TLRs, metilación, región promotora, silenciamiento génico.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease characterized by an excessive accumulation of fat accompanied by moderate chronic inflammation (metainflammation). Mexico ranks second in global obesity in adults, so studies of obesity in this country are crucial to describe, understand and combat this disease. Diet in conjunction with moderate aerobic exercise is the most effective non-pharmacological treatment to combat obesity. Recent evidence calling metainflammation that has an important component in the development of obesity is regulated by the action of Toll Like Receptors (TLRs); particularly by TLR2, TLR4 and TLR9; recently began to study and describe how diet and exercise stimuli cause methylation changes in TLR genes promoter region triggering gene silencing translated into gene subexpression. It knows that some miRNAs regulate TLRs expression. Expression's change of miRNAs also has been associated with diet and / or exercise stimuli. For purposes of knowing more about the relationship: methylation - TLRs - diet and exercise as well as the relationship: miRNAs - TLRs - diet and exercise; a program of hypocaloric diet and moderate aerobic exercise was designed; this program was applied to 16 people aged 30 to 40 years with overweight, grade I obesity and grade II obesity without associated comorbidities. TLR2, TLR4 and TLR9 promoter region methylation's degree was characterized from patient's samples; We also studied the TLR2, 4, 9 gene expression and finally five TLR's silencing associated expression miRNA's (at the serum and cellular level).

Anthropometric results showed a significant measures decrease; biochemical results showed same tendency in response to diet and exercise program. Regarding expression of TLR2 and 4, gene expression decrease was observed with $p = 0.012$ and 0.047 respectively; TLR's silencing associated expression miRNA's shows a significant increased and finally diet and exercise program caused methylation increase of 15.4% in TLR2 and 10% in TLR4.

Keywords:

Obesity, moderate chronic inflammation, metainflammation, methylation, promoter region, gene silencing, miRNAs, hypocaloric diet, moderate aerobic exercise.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta tesis fue cuantificar algunos de los mecanismos de silenciamiento génico (grado de metilación de las regiones promotoras de los TLR2, TLR4 y TLR9 e identificación de miRNAs asociados) a nivel de DNA o RNA en leucocitos de pacientes con sobrepeso, obesidad grado I y II bajo tratamiento de dieta y ejercicio.

Los genes TLR2, TLR4 y TLR9 se encuentran íntimamente implicados en el desarrollo de la inflamación sistémica moderada característica de la obesidad. Para poder conectar todos los temas que se manejan en este trabajo; se describirá qué es el silenciamiento génico, cómo opera y qué mecanismos lo rigen; posteriormente se tratará la obesidad: ¿cómo se define?, ¿qué es?, ¿a qué patologías se encuentra asociada? y, si existe algún factor genético asociado a ésta; también explicaremos cómo se desarrolla, epidemiología a nivel mundial y en nuestro país. Se menciona cómo se mide la obesidad, qué es el IMC, cómo se trata la obesidad con énfasis en la dieta y el ejercicio.

Silenciamiento génico.

El silenciamiento génico es un proceso que cumple diversos objetivos dentro del metabolismo y funcionamiento de los seres vivos, entre ellos está la regulación de la expresión de RNA mensajero, la eliminación y control de material genético extraño. El silenciamiento génico se lleva a cabo por dos tipos de mecanismos principalmente: Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS) y el Silenciamiento Génico Transcripcional (TGS).

El PTGS actúa directamente sobre el transcrito de RNA mensajero; en este mecanismo se refiere principalmente a la unión de RNAs no codificantes (ncRNAs) denominados también RNAs reguladores a mRNA. Los ncRNAs se unen al RNA mensajero y justo como su nombre lo indica al unírsele regulan el producto de la transcripción. Existen diversos tipos de ncRNAs entre los que destacan: RNAs pequeños nucleares (snRNA),

RNAs largos no codificantes (lncRNAs), RNAs pequeños interferentes (siRNAs), y los micro RNAs (miRNAs). Los ncRNAs regulan un sin número de funciones ligadas a la expresión génica, entre las más importantes destacan el corte y empalme de los intrones genómicos y la maduración del RNA mensajero (mRNA) (Valadkhan et al., 2013, Matera et al., 2014, Guo et al., 2014).

El TGS actúa indirectamente sobre la expresión génica y establece un control que impide la transcripción del DNA; a este tipo de procesos se les denomina procesos epigenéticos y se basan en acciones mediadas por modificación de histonas o bien por el proceso de metilación en regiones promotoras de los genes.

- Silenciamiento Génico Postranscripcional (PTGS).

Como se mencionó anteriormente el PTGS es mediado principalmente por RNAs reguladores; los más estudiados son:

I. RNAs pequeños nucleares (snRNA).

Los snRNAs como su nombre lo sugiere son pequeñas secuencias de RNA de aproximadamente 150 nucleótidos; éstas se encuentran principalmente en las motas de empalme y los cuerpos de Cajal dentro de los núcleos celulares de eucariontes; su principal función es procesar el RNA pre mensajero [al cual se le conoce como heterogéneo nuclear (hnRNA)] dentro del núcleo celular. Se ha observado que los snRNAs ayudan a ejercer su función a factores transcripcionales y también auxilian a la polimerasa II al mantenimiento de los télomeros.

El snRNAs siempre se encuentran asociados a un conjunto específico de proteínas a las cuales se les denomina ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (sNRNPs), estas proteínas forman parte del spliceosoma (ver figura 1). El spliceosoma es un complejo multiprotéico que regula la maduración el RNA mensajero (mRNA); éste complejo está formado por

cinco distintas ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (sNRNPs): U1, U2, U4, U5, y U6 y, más de 150 proteínas (Matera et al., 2014, Guo et al., 2014, Valadkhan et al., 2013).

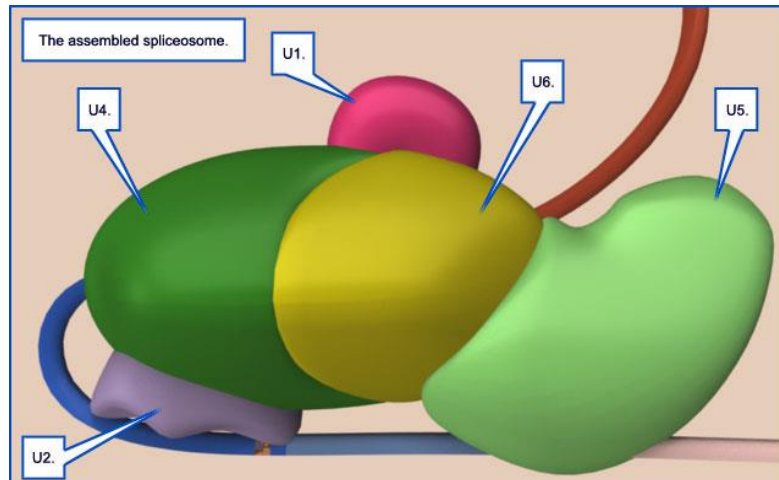


Figura 1. Spliceosoma (tomada de la revista Cell y del libro Molecular Biology, principles of genome function).

II. RNAs largos no codificantes (lncRNAs).

Los lncRNAs tienen una longitud de alrededor de 200 nucleótidos (Ma et al., 2014); la función biológica más estudiada en estos RNAs es la regulación epigenética de la expresión alélica. Diversos estudios han establecido que los lncRNAs en mamíferos, regulan específicamente procesos de compensación de dosis genómica; uno de los procesos de compensación de dosis genómica más importantes es, la inactivación del cromosoma X (Lyon, et al., 1961; Lee et al., 2011; Kung et al., 2013; Kinnaird et al., 2016).

III. RNAs pequeños interferentes (siRNAs).

Los siRNAs tienen una longitud de entre 21 a 23 nucleótidos y son bicatenarios; son altamente específicos para la secuencia de nucleótidos de su RNA mensajero blanco; al igual que otros RNAs reguladores, “interfieren” (o regulan) la expresión de un gen blanco.

A este mecanismo se le conoce como interferencia de RNA; el mecanismo consiste en cortar el RNA mensajero (mRNA) complementario en dos mitades, esto se realiza a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA con un complejo multiprotéico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*); las dos mitades del mRNA son degradadas posteriormente por la maquinaria celular, lo que ocasiona la supresión de la expresión del gen (Rana et al., 2007). Otras funciones que se han descrito en los siRNAs son; la defensa antiviral y ser mediadores en la organización de la estructura de la cromatina en un genoma.

Para que se generen los siRNAs existe un proceso de maduración. El siRNA originalmente proviene de un mRNA bicatenario más grande al que se le denomina dsRNA y es inicialmente reconocido por una enzima RNasa III, proveniente de la familia de las nucleasas llamada Dicer. Dicer procesa el dsRNA en fragmentos de entre 21 a 23pb, estos fragmentos ya son los siRNAs maduros; éstos se unen al antes mencionado complejo multiprotéico conocido como RISC el cual tiene actividad de RNasa; el complejo formado por la unión del siRNA + RISC se une al mRNA blanco en su terminación de poli-A y lo degrada (Bantounas et al., 2004; Hannon et al., 2002; MacManus et al., 2002). Ver figura 2.

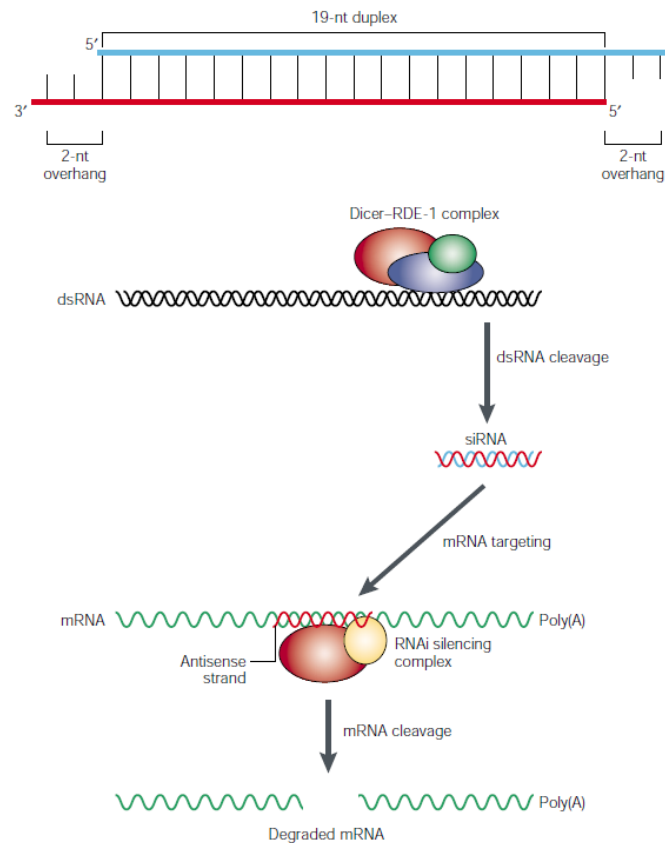


Figura 2. Proceso de maduración de los siRNAs y silenciamiento mediado por los mismos (tomada de MacManus 2002).

IV. Micro RNAs (miRNAs)

Un microRNA (miRNA) se define como un RNA unicatenario con una longitud de 18 a 24 nucleótidos, al igual que los siRNAs es generado por la enzima Dicer a partir de un transcrito endógeno que contiene una estructura de horquilla (Vásquez Ortiz et al. 2006). Los miRNAs regulan la síntesis de proteínas uniéndose a la región UTR codificante de los RNA mensajeros (mRNA's). Un solo miRNA puede regular la expresión de miles de mRNAs y proteínas (Bartel et al., 2004).

Los miRNAs se asemejan bastante a los siRNAs, incluso tienen la misma vía de inhibición; la diferencia clave es que los miRNAs provienen de un RNA unicatenario el

cual se dobla sobre sí mismo para posteriormente formar horquillas cortas; mientras que siRNAs se derivan de regiones de doble cadena más largos RNA (Bartel et al., 2004).

Los genes que codifican para los miRNAs son mucho más largos que los miRNA procesados maduros. Los miRNAs se transcriben inicialmente como transcritos primarios o pri-miRNA que cuentan con un capuchón en 5' y una cola de poli-adeninas (poli-A) en 3'; éstos se procesan en el núcleo celular en estructuras de 70 nucleótidos en forma de horquilla (*stem-loop*) conocidas como pre-miRNA. El procesamiento se realiza por un complejo multiproteico llamado “microprocesador”, que consta de la nucleasa Drosha y la proteína de unión a RNA de doble hélice Pasha. Los pre-miRNA son procesados posteriormente a miRNAs maduros en el citoplasma mediante la interacción de la enzima Dicer que inicia la formación del complejo RISC el cual finalmente, al unirse al mRNA blanco lo degrada (Bernstein et al 2001., Kurihara et al., 2004; Gao et al., 2007; Stark et al., 2008). Ver figura 3.

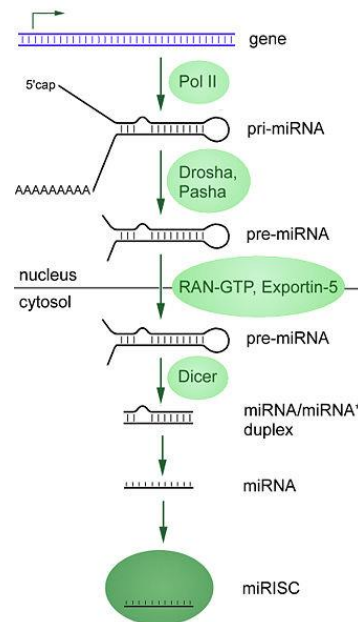


Figura 3. Proceso de maduración de los miRNAs y silenciamiento mediado por los mismos (tomada de Esquela-Kerscher et al., 2006).

- Silenciamiento Génico Transcripcional (TGS); mecanismos epigenéticos de regulación génica.

Dentro de los organismos eucariontes, existen diversos mecanismos que regulan la expresión génica; entre estos mecanismos, en los últimos años se ha puesto especial atención en los mecanismos epigenéticos (Berger et al., 2009, Waddington et al., 1939, Kaminker et al., 2007, Jaenisch et al., 2003). La definición de epigenética cita que “La epigenética es un sistema de regulación que controla la expresión de los genes sin afectar a la composición de los genes en sí mismos” (Waddington acuñó este término en 1939).

Los mecanismos epigenéticos de regulación génica son 2 principalmente: Metilación del DNA en regiones de promotor y modificación de histonas.

I. Metilación de DNA en regiones de promotor.

Consiste en la unión de grupos metilo (- CH₃) (ver figura 4) a secuencias del DNA que se conocen como CpG; a lo largo de todo el genoma existen muchísimas secuencias CpG a éstas se les denomina “islas CpG” o bien “sitios CpG” (en caso de que sea uno solo y se encuentre a más de 20 pb de distancia de otro). Una isla CpG, no es más que una parte de la secuencia de una cadena DNA donde una citosina (C) se encuentra unida a una guanina (G); se les denomina CpG porque se refiere a la unión que existe entre estos dos nucleótidos que está dada por un enlace fosfodiéster (de allí la “p entre el átomo de carbono 3' de un nucleótido y el carbono 5' de otro nucleótido (ver figura 5); se le da esta notación tan particular y enfática, para aclarar que no se refiere al enlace que existe entre dos nucleótidos que pertenecen a las dos cadenas que conforman el DNA, es decir no es el enlace que existe en el DNA por puentes de hidrógeno, sino que es el enlace que se da de manera normal entre nucleótidos en una misma cadena. La metilación se lleva a cabo en el carbono 5' de la citosina y la transforma a 5-metilcitosina (Química orgánica de Robert Thornton 1998; <http://www.istockphoto.com/mx>).

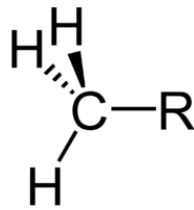


Figura 4. Grupo metilo (tomada del libro “Química Orgánica” de Thornton, ISBN 9684443404).

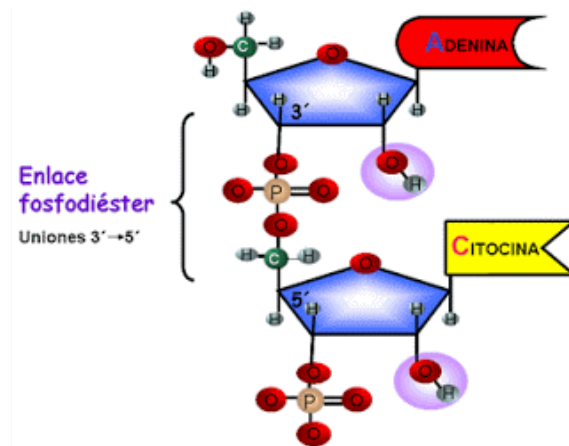


Figura 5. Enlace fosfodiéster (tomada de <http://www.istockphoto.com/mx>, obra de luoman).

La metilación de islas CpG toma particular importancia cuando se encuentra ubicada en la región de promotor de los genes, debido a que; si una isla CpG forma parte de un sitio de unión a factores de transcripción, éste grupo metilo bloquea esta unión y provoca silenciamiento génico; es decir inhibe la expresión génica del gen que se encuentra metilado en su promotor. Esto no es un fenómeno fortuito, desde que se descubrió la metilación de islas CpG en regiones de promotor, se comenzó a estudiar a fondo este sistema y se descubrió que, este es un proceso normal e importante que forma parte del sistema de regulación de expresión génica, al grado que la metilación del DNA es esencial en el proceso de desarrollo embrionario y se asocia con una serie de procesos clave, incluyendo la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, la represión de elementos repetitivos, el envejecimiento y la carcinogénesis [(la metilación de genes supresores de tumores desencadena la activación de genes conocidos como protooncogenes que posteriormente se transforman en oncogenes por procesos de daño

(mutaciones) y desencadena en carcinogénesis) (Capuano et al., 2014)]. La investigación de vanguardia asocia al almacenamiento de la memoria a largo plazo en seres humanos con la regulación mediada por metilación del DNA (Miller et al., 2007; Powell et al., 2008; García et al., 2012).

La metilación es un proceso crucial en el desarrollo embrionario y la regulación de la expresión génica.

Hoy en día se reconoce que existen básicamente dos mecanismos de metilación del DNA:

- a. Metilación de Mantenimiento
- b. Metilación *de novo*.

- a. Metilación de Mantenimiento

La metilación de mantenimiento se refiere a los patrones de metilación del DNA que se transmiten de células madres a las células hijas con una alta fidelidad después de cada ciclo de replicación del DNA celular; tiene como finalidad desactivar genes de proliferación que se encuentran activos sólo durante el desarrollo embrionario; este tipo de metilación es fundamental en la vida de un organismo y evita que se activen procesos tumorales y de carcinogénesis (Rönn et al., 2013; García et al., 2012). La metilación es mediada por una familia de proteínas llamadas DNA metil transferasas (DNMTs); la DNMT1 es la responsable de regular que los patrones de metilación de mantenimiento de DNA se mantengan intactos (Rönn et al., 2013; García et al., 2012).

- b. Metilación *de novo*.

Se refiere a la generación de metilación de citosinas en DNA no metilado de manera constitutiva durante la embriogénesis; ésta es llevada a cabo por las DNAMT3A y

DNAMT3B (es posible que estas DNAMTs también tengan actividad demetilasa de DNA) (Goll et al., 2005; Klose et al., 2006). La metilación *de novo* se da en respuesta a estímulos medioambientales como son radiación, ejercicio, dieta, calor, frío, exposición a sustancias químicas, entre otros y se considera como el sistema de regulación epigenética más importante que existe en el organismo (Kim et al., 2009; Rakyan et al., 2001; Ling et al. 2014, Klose et al., 2006; Barrès et al., 2012). Recientes estudios en mamíferos mencionan que el consumo de nutrientes específicos como la metionina, colina, el ácido fólico y las piridoxinas tienen como función la adición de grupos metilos; por lo que ahora se reconoce que la dieta es parte del sistema metilante "*de novo*" (Klose et al., 2006). Múltiples estudios han demostrado que el ejercicio de intensidad moderada resulta en aumento de metilación de DNA en el músculo esquelético y en tejido adiposo (Barrès et al., 2012; Rönn et al., 2013; Ling et al., 2014). Un estudio de Rönn realizado en un grupo de hombres originalmente sedentarios de mediana edad que fueron sometidos a seis meses de ejercicio demostró aumento de metilación en diversos genes de células que conforman el tejido adiposo (Rönn et al., 2013).

II. Modificación de histonas.

El DNA se encuentra súper enrollado dentro del núcleo de las células eucariontes, este súper empaquetamiento se da gracias a un grupo de proteínas llamadas histonas, al conjunto histonas-DNA se le conoce como cromatina; una unidad de cromatina está compuesta por un octámero de histonas (nucleosoma) y aproximadamente 140 pares de bases de DNA (Biología Molecular de la célula de Bruce Alberts). Existen modificaciones postraduccionales que pueden modificar la configuración de las histonas. Éstas, se generan por procesos de acetilación, fosforilación, metilación, deaminación, isomerización de prolinas y ubiquitinización. Combinaciones específicas de modificación en las histonas dictan mediante una especie de código si un/os gen/es ha de ser silenciado/s o expresado/s; la modificación de histonas es otra forma de cómo se puede dar la regulación de la expresión génica (Wu et al., 1996, Berger et al., 2009; García-Giménez et al., 2012). Dentro de los procesos de modificaciones de histonas existen por ejemplo,

los procesos de acetilación y desacetilación de lisinas que se correlacionan con accesibilidad de la cromatina y transcripción, mientras que el efecto de la metilación de lisinas depende del número de grupos metilo y posición de los residuos de lisina (Bártová et al., 2008; Kim et al., 2009; García et al., 2012; Ling et al 2009; Ling et al 2014).

Se encuentra completamente demostrado que las modificaciones a nivel de histonas afectan el estado de desdoblamiento (desempaquetamiento) de las secuencias del DNA, lo que a su vez provoca errores en accesibilidad a éste dentro del núcleo por factores transcripcionales y desencadena silenciamiento en la expresión génica o incluso problemas cromosómicos graves que en estado embrionario pueden llevar a la interrupción del proceso de embriogénesis o pérdida del producto; por todo esto, se considera que el estado de la cromatina es de importancia crítica para la transcripción normal de los genes (Devaskar and Raychaudhuri 2007; Sherin et al., 2008).

Obesidad.

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial determinada por factores genéticos y medioambientales; se origina a partir de un desequilibrio energético positivo (Mayor cantidad de calorías consumidas que la cantidad de calorías gastadas); como resultado al exceso calórico se observa un incremento patológico de tejido adiposo, éste conduce a un aumento en el riesgo de mortalidad y de aparición de comorbilidades. El sobrepeso y la obesidad son provocadas tanto por una ingesta excesiva (de alimentos/bebidas), como por un escaso gasto energético (inactividad, sedentarismo).

La obesidad se encuentra altamente asociada a un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DT2), enfermedades cardiovasculares, osteoartritis e incluso algunos tipos de cáncer (Arteaga., 2012; Bulló et al., 2007; Pischon et al., 2008; Lementowski PW, Zelicof SB. Lementowski & Zelicof SB., 2008; Jarrett., 1981).

El factor genético (hereditario) que promueve la aparición de sobrepeso y/u obesidad comenzó a investigarse en las primeras décadas de este siglo. Datos actuales indican que alrededor de un 20% de los sujetos obesos tienen antecedentes familiares de obesidad por factores genéticos mientras que el resto desarrollan obesidad por otros factores [(Barquera., 2007; Olaiz-Fernández et al., 2006 (ENSANUT 2006)]. Se ha descrito que menos del 15% de la variación de la grasa corporal es de causa genética, del 30 al 40% se debe a factores culturalmente transmitidos, y alrededor del 45% restante por factores ambientales no transmisibles. Por todo esto, el exceso de grasa puede considerarse un asunto de herencia cultural, genética y de interacción [Barquera., 2007; Olaiz-Fernández et al., 2006 (ENSANUT 2006)].

La definición de obesidad de la OMS (Centro de prensa OMS) dicta:

“La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.”

Sin embargo la definición “clásica” que maneja la OMS no es del todo completa; en los últimos 30 años se ha descrito que existe un factor inflamatorio importante dentro de la obesidad (conocido como inflamación sistémica o metainflamación); existen múltiples estudios que reconocen la metainflamación; por ejemplo Duncan y sus colaboradores mostraron que, el aumento de marcadores pro-inflamatorias puede predecir la aparición de obesidad (Duncan et al 2003). Ya se encuentra ampliamente aceptado que la metainflamación que se presenta en obesidad se mantiene de manera crónica y de intensidad moderada por lo que la definición extendida de obesidad dicta: “La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y está acompañada por una inflamación crónica moderada característica” (Vgontzas et al., 2000; Richelsen et al., 2001; Nishimura and Murayama. 2001).

En cuanto a su distribución, la obesidad es un problema de salud a nivel mundial que se encuentra dentro de las más importantes agendas multinacionales; ésta afecta a países tanto desarrollados como a países en vías de desarrollo por igual (World Health Organization Technical report series 894).

- Epidemiología del sobrepeso y la obesidad; problemática del sobrepeso y la obesidad en el mundo y en México.

La obesidad desencadena una gran cantidad de comorbilidades, muchas de ellas pueden conducir a la muerte; de hecho, la obesidad se ha ubicado como una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial; por esto la prioridad en la investigación sobre obesidad a nivel mundial es crucial.

México actualmente es el segundo lugar en obesidad en adultos a nivel mundial con un 33.3% según la “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016 [Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)]. Esto es un problema grave a nivel poblacional y no solo eso, además la cifras de ENSANUT MC 2016 estiman que en México existe un 76.6% de obesidad abdominal; misma que se encuentra altamente asociada a comorbilidades como DT2, síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, hipertensión y alteraciones cardiovasculares que desencadenan en afecciones cardiacas entre otras. El problema de obesidad en México no sólo no se ha logrado solucionar, todo lo contrario, ha ido en aumento; la “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012)” estimaba 74% de obesidad abdominal [World Health Organization Technical report series 894; FAO. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe: 2012 (Reporte FAO 2013), Gutiérrez et al., 2012 (ENSANUT 2012), Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)] mientras que las estimaciones ahora

arrojan un 76.6% pandemia ha ido empeorando (Figuras 6 y 7) [Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)].

Como resultado a la pandemia de obesidad tanto en México como en todo el mundo se han comenzado a desarrollar y aplicar estrategias de educación nutricional destinadas a promover formas de vida saludables, entre las cuales destaca una cultura alimentaria adecuada, la práctica de ejercicio y políticas de desarrollo social y económico asociadas a un estilo de vida saludable [Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)].

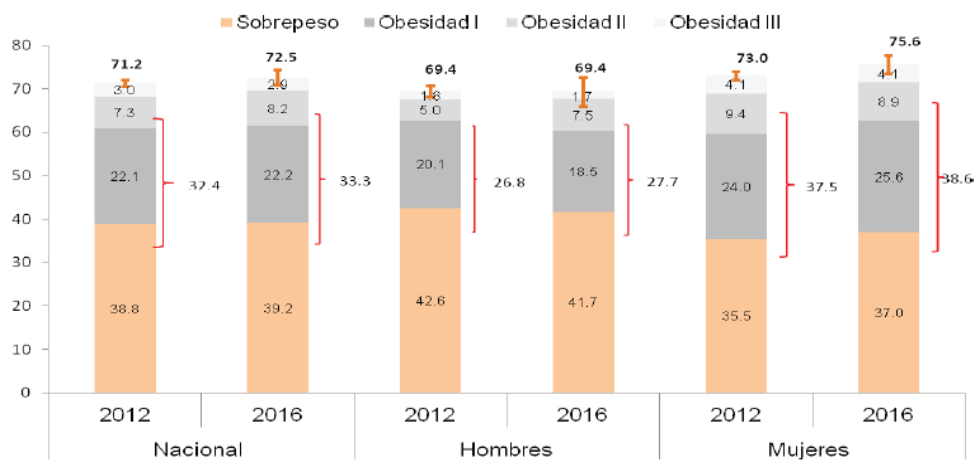


Figura 6. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016 [Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)].

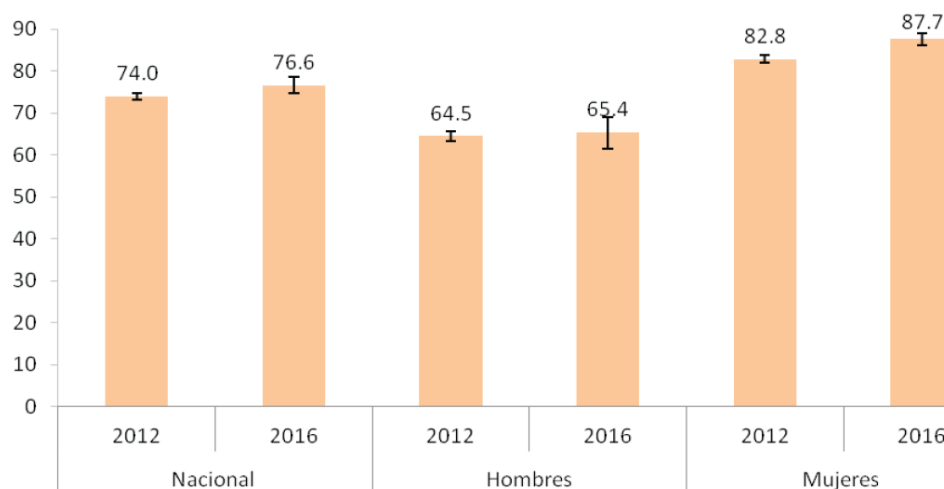


Figura 7. Tendencia de obesidad abdominal nacional, en hombres, mujeres en personas de 20 años en adelante según la ENSANUT MC 2016 [Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)].

- Clasificación de obesidad de acuerdo al exceso de peso corporal

La obesidad se puede definir según la cantidad de grasa corporal; los sujetos obesos son aquellos que presentan porcentajes de grasa corporal por encima de los valores considerados normales (entre 10 y 20% del peso total en los varones y entre 20 y 30% del peso total en las mujeres) (Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. 2005).

El peso corporal total correlaciona directamente con el porcentaje de grasa corporal total, de esta manera se genera un parámetro (índice) adecuado para cuantificar el grado de obesidad.

En la práctica clínica, las estimaciones con base al peso corporal total son la primera y más utilizada herramienta para valorar el grado de sobrepeso; para estimar este sobrepeso se utilizan varias herramientas:

I. Tablas de peso y talla.

Éstas toman en cuenta: sexo, talla, raza y constitución física; están basadas en la observación de diferencias notorias del riesgo de mortalidad entre grupos de individuos obesos con respecto a individuos de "peso deseable" para su edad y sexo. Esta clasificación presenta un inconveniente, las tablas fueron confeccionadas para evaluar mortalidad y no morbilidad, y por otro lado no pueden ser extrapoladas de una población a otra.

II. Índices.

El más comúnmente usado es el índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet; si bien no es un excelente indicador de adiposidad en individuos con alto o bajo desarrollo muscular como deportistas y ancianos, es el índice más empleado en la mayoría de los estudios epidemiológicos y, es el más recomendado por diversas sociedades médicas y organizaciones de salud internacional para el uso clínico, debido a su reproducibilidad, facilidad de utilización y capacidad de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población (Diez datos sobre la obesidad, clasificación del IMC; 2011). El IMC es una expresión del peso referido a la talla y se calcula dividiendo el peso corporal expresado en kilogramos por la talla elevada al cuadrado expresada en metros, la fórmula para su cálculo es la siguiente (Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. 2005):

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Talla (m}^2\text{)}$$

Las ventajas que presenta el IMC es que correlaciona en un 80% con la cantidad de tejido adiposo y en forma directamente proporcional con el riesgo de morbilidad.

El comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso en 1997 una clasificación de sobrepeso y obesidad aplicable tanto a hombres como mujeres en edad adulta con base al IMC, el punto de corte para definir la obesidad es de un valor de $IMC = 30 \text{ kg/m}^2$, limitando el rango para la normalidad a valores de IMC entre $18.5 - 24.9 \text{ kg/m}^2$, y el de sobrepeso a valores de IMC entre $25 - 29.9 \text{ kg/m}^2$ (Ver tabla 1) (Manson et al., 1995).

- Clasificación de la obesidad según el Índice de Masa Corporal (IMC) según la OMS

Sobrepeso y obesidad se definen como un trastorno metabólico crónico en el cual se presenta una excesiva acumulación de energía en forma de grasa depositada en el tejido adiposo, esta acumulación exacerbada de tejido adiposo provoca un aumento del peso corporal.

La Norma Oficial Mexicana 043 (NOM043) define al Sobrepeso como el estado caracterizado por la existencia de un índice de masa corporal (IMC) igual o mayor a 25 kg/m^2 y menor a 29.9 kg/m^2 y en las personas adultas de estatura baja, igual o mayor a 23 kg/m^2 y menor a 25 kg/m^2 ; a su vez define a la obesidad como una enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, la cual se determina cuando en las personas adultas existe un IMC igual o mayor a 30 kg/m^2 y en las personas adultas de estatura baja igual o mayor a 25 kg/m^2 (NOM-043-SSA2-2012 “Servicios Básicos de Salud. Promoción y Educación en Materia Alimentaria. Criterios para Brindar Orientación”).

El IMC se calcula al dividir el peso corporal medido en kilogramos entre la estatura en metros cuadrados. El IMC regular es de 20 a 25 kg/m^2 . (Ver tabla 1).

Clasificación de la OMS del estado nutricional de acuerdo con el Índice de Masa Corporal (IMC)		
Clasificación	IMC (kg/m²)	
	Valores principales	Valores adicionales
Infrapeso	<18,50	<18,50
Delgadez severa	<16,00	<16,00
Delgadez moderada	16,00 - 16,99	16,00 - 16,99
Delgadez aceptable	17,00 - 18,99	17,00 - 18,49
Normal	18.5 - 24,99	18.5 - 22,99
		23,00 - 24,99
Sobrepeso	≥25,00	≥25,00
Preobeso	25,00 - 29,99	25,00 - 27,49
		27,50 - 29,99
Obeso	≥30,00	≥30,00
Obeso tipo I	30,00 - 34,99	30,00 - 32,49
		32,50 - 34,99
Obeso tipo II	35,00 - 39,99	35,00 - 37,49
		37,50 - 39,99
Obeso tipo III	≥40,00	≥40,00

Tabla 1.- Clasificación de sobrepeso/obesidad según el IMC por la OMS (es importante considerar que esta clasificación fue diseñada para personas adultas).

El error más importante a tomar en cuenta cuando se utiliza el IMC para estimar la cantidad de grasa corporal es que ésta no toma en cuenta las diferencias entre tejidos adiposo y magro; ni tampoco distingue entre las diferentes formas de adiposidad (androide y ginecoide), de las cuales algunas pueden estar asociadas de forma más estrecha con el riesgo cardiovascular (androide) (Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. 2005).

La mortalidad está incrementada en condiciones de obesidad cuando se presenta un IMC mayor a 32 (se encuentra asociado con el doble de riesgo de muerte). Se ha observado que al existir obesidad se presentan alteraciones en la respuesta del organismo a la insulina (resistencia a la insulina), y también se presenta un estado proinflamatorio incrementado aunado a una tendencia incrementada a la trombosis (estado pro trombótico) (Bray, 2004); adicionalmente ha sido altamente asociado a marcadores de complicaciones secundarias de obesidad, incluidos la hipertensión arterial, lípidos en sangre, niveles de insulina sérica y mortalidad a largo plazo (tabla 2) (Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. 2005).

- Alteraciones metabólicas asociadas al desarrollo del sobrepeso y la obesidad

Existe una variedad de alteraciones metabólicas que se asocian a la obesidad; a estas también se les conoce como "comorbilidades"; entre ellas figuran:

- ✓ Hipertensión
- ✓ Dislipidemia
- ✓ Intolerancia a la glucosa (resistencia a la insulina)
- ✓ Hiperinsulinemia
- ✓ Diabetes Mellitus tipo 2 (DT2)
- ✓ Síndrome metabólico
- ✓ Enfermedades cardiovasculares
- ✓ Esteatohepatitis
- ✓ Y algunas otras más

El origen de estas comorbilidades se desprende del desbalance energético positivo (las calorías que se consumen superan a las que se gastan); en condiciones de desbalance energético positivo se genera una acumulación de tejido adiposo considerado patológico.

El tejido adiposo no sólo es un tejido termogénico, también es un tejido endócrino que desata la señalización de mensajeros (citocinas) que se vuelve excesiva ya que el tejido adiposo en sí, se encuentra en un volumen excesivo; además este tejido en exceso promueve una liberación incrementada de ácidos grasos libres (Bullo et al., 2006). La producción de citocinas y ácidos grasos libres tiene efectos sobre la producción de la insulina; entre estos se observa una disminución en la sensibilidad a la acción de ésta, así como alteraciones del metabolismo de glúcidos y lípidos. A nivel sistémico estas alteraciones se traducen en un aumento de mortalidad y morbilidad (Vásquez et al., 2011).

La asociación entre una variedad de alteraciones metabólicas y un estado de resistencia a la insulina fue propuesta por primera vez por Gerald M. Reaven en la lectura de la serie de Banting de la Asociación Americana de Diabetes en 1988 (Bray et al., 1980). Reaven planteó que la resistencia a la insulina es un fenómeno que se asocia con la intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión, y que tales anormalidades representan el conjunto determinante de alto riesgo de enfermedad cardiovascular (Mingrone et al., 2000).

Datos epidemiológicos han demostrado que existe un aumento de morbilidad y mortalidad cuando el IMC supera 25 kg/m^2 ; por otro lado el incremento del IMC ha demostrado guardar una relación directa con el aumento de los riesgos de hipertensión arterial, DT2, alteración coronaria y cambios perjudiciales en el nivel de lípidos séricos (Vásquez et al., 2011).

Existen varios estudios donde se asocia el IMC alto con el desarrollo de DT2 (Bray et al., 1980; Bray et al., 2004; Mingrone et al., 2000); el riesgo relativo de diabetes en hombres con $\text{IMC} > 35 \text{ kg/m}^2$ es 40 veces mayor que en hombres con $\text{IMC} < 23 \text{ kg/m}^2$. En mujeres el riesgo relativo en el primer grupo es 61 veces mayor que en el segundo (Alfieri et al., 1997; Ravussin et al., 1992).

De entre los estudios que relacionan desarrollo de la DT2 con el IMC, existe un estudio el cual asocia indirectamente el IMC con la tasa de síntesis de adenosín trifosfato (ATP); en éste se observó una reducción del 30% en la tasa de síntesis de ATP a mayor grado DT2 (y mayor IMC) (Samuel et al., 2010). Por otro lado en estudios realizados mediante microarreglos enfocados también al desarrollo de DT2 en los cuales se ha utilizado el IMC como parámetro para estimar el grado de obesidad, se ha asociado la expresión de factores de la familia de los receptores nucleares con el IMC. Mootha y Patti en el 2003 en sus respectivos estudios asociaron los niveles de expresión del receptor de proliferación de peroxisomas gama (PPAR γ) y el receptor de proliferación de peroxisomas beta/delta (PPAR β/δ) respectivamente con el IMC en tejido muscular de pacientes con DT2 (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). Algunos investigadores han propuesto una asociación entre el desarrollo de la obesidad (medida por el IMC) y la expresión de Factores Transcripcionales (TF's) (Loftus and Lane; 1997). En el 2009 Tien-Jyun mostró cómo la expresión del gen de fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCK) en tejido adiposo visceral de mujeres no diabéticas correlaciona con el IMC (Tien-Jyun et al., 2008).

Respecto a cómo la obesidad repercute de manera distinta según la edad de la persona; se ha descrito que la obesidad de inicio juvenil provoca el desarrollo de un mayor número de adipocitos, este tipo de desarrollo adipocítico es el de mayor severidad pronostica. Por otro lado, en la obesidad que comienza en edades adultas se ha observado que predomina la hipertrofia de adipocitos. En ambos casos se presenta un deterioro perceptivo de la sensación de saciedad (Duncan et al., 2003).

El ejercicio y una dieta balanceada como tratamiento del sobrepeso y la obesidad.

Ejercicio físico.

A lo largo de la historia se ha mencionado lo importante que es llevar una buena alimentación y realizar ejercicio físico para tener salud; los griegos y los romanos ya practicaban regímenes que asociaban el ejercicio físico con las restricciones alimenticias

para mantener una buena salud. No fue sino hasta la segunda mitad del siglo XX (en la década de los 50's) que una multitud de investigaciones lograron asociar que la actividad física en forma de ejercicio incidía directamente en la salud de las personas (Paterno et al., 2003; Bouchard et al., 1997; Roth et al., 1985/2007). Por años se conoce que dietas balanceadas contribuyen de manera crucial en la salud de las personas y por tanto que dietas no balanceadas promueven se rompa el balance energético consumo / gasto calórico y generen ácidos grasos que a su vez promueven un aumento en el tamaño del tejido adiposo.

- Ejercicio aeróbico

El término ejercicio indica movimientos diseñados y planificados específicamente para estar en forma y gozar de buena salud.

El ejercicio aeróbico comprende ejercicios de media o baja intensidad, así como diversidad a cuanto a duración del/os estímulo/s, donde el organismo necesita emplear hidratos y grasas para obtener energía por medio del consumo de oxígeno. El correr, nadar, andar en bicicleta, caminar son algunos ejemplos de ejercicios aeróbicos. El consumo de oxígeno (O_2) durante el ejercicio es un sistema que promueve la renovación de ATP; estas reacciones se dan exclusivamente en la mitocondria. Este sistema entra en funcionamiento (a re-sintetizar ATP) a partir del primer minuto de iniciado el ejercicio. Se pueden usar ácidos grasos como combustible, dependiendo de la intensidad del estímulo; algunos autores mencionan que durante los primeros 30 minutos de ejercicio usa glucógeno como fuente energética (Acosta-felquer & De la rosa., 2002), sin embargo ahora sabemos que estímulos físicos a ciertas intensidades promueven la utilización de un sustrato u otro como fuente de energía.

La intensidad del ejercicio aeróbico se puede medir con relación al volumen de oxígeno máximo consumido por el cuerpo. Pero para fines prácticos, se calcula con la frecuencia de las pulsaciones cardíacas por minuto.

La frecuencia máxima o número máximo de pulsaciones por minuto (NPM) que puede alcanzar un corazón sano con seguridad, se calcula mediante una constante de 220 (para hombres) y 226 (para mujeres) a la cual se le resta la edad, es decir:

$$\text{NPM para hombres} = 220 - \text{Edad}$$

$$\text{NPM para mujeres} = 226 - \text{Edad}$$

Algunos de los beneficios del ejercicio aeróbico son:

1. Disminución de presión sanguínea a mediano plazo, efecto benéfico en personas que presentan problemas de hipertensión.
2. Baja en los niveles de colesterol total en la sangre.
3. Baja en la concentración de colesterol LDL o "colesterol malo".
4. Baja en los niveles de triglicéridos.
5. Aumento en colesterol HDL o "colesterol bueno", reduciendo el riesgo de un ataque cardíaco.
6. Reducción glucémica en niveles sanguíneos efecto benéfico en personas que presentan problemas de glucemia.
7. Al practicar un ejercicio aeróbico, se emplea glucosa, la cual proviene de la sangre. De esta manera los niveles de glucosa en la sangre disminuyen y las personas que presentan problemas de Diabetes se pueden ver beneficiados con esta práctica.
8. Mejora de la capacidad pulmonar, la circulación en general y el aprovechamiento del oxígeno.
9. Reduce la mortalidad provocada por eventos cardiovasculares

10. Aumento en la reabsorción de calcio por los huesos (aceleración en la remodelación ósea), fortaleciéndolos y disminuyendo el riesgo de fracturas.
 11. Disminución en los niveles circulantes de adrenalina (hormona altamente asociada a estrés),
 12. Aumento de los niveles de endorfinas y otras sustancias cerebrales, lo que contribuye a bajar la tensión emocional y mejorar el estado anímico, lo cual se refleja en una gran sensación de bienestar físico, emocional y social.
 13. Fomento de neurogénesis (regeneración de neuronas y nuevas conexiones de las mismas).
- Ejercicio físico y su relación con el sobrepeso y la obesidad.

El efecto del ejercicio físico sobre la obesidad tiene diferentes variables de estudio como son el grado de la obesidad, modificación ingesta calórica, duración del estudio, la adhesión a un programa, el tipo de ejercicio, así como el volumen y la intensidad del ejercicio (Laskowski. 2012).

La pérdida de peso se consigue mediante un cambio en el balance de energía, que implica una reducción en la ingesta calórica, un aumento en actividad física, o ambos. Los estudios que analizan la relación del efecto del ejercicio físico sobre obesidad se han centrado en el papel de la actividad física con respecto a la pérdida de peso, la prevención de aumento de peso y evitar la recuperación del peso una vez que el peso se pierde. El ejercicio aeróbico sólo, en ausencia de modificación de la dieta ha demostrado que produce la pérdida de peso, pero, al ser combinado con la restricción calórica logra mostrar resultados más significativos. (Moinuddin et al., 2012). La actividad física como tratamiento de obesidad de manera individual (sin modificación de la dieta) ha demostrado ser insuficiente para producir pérdida de peso significativa, especialmente cuando la intensidad de la actividad moderada recomendada según el Colegio Americano de Medicina del Deporte y la American Heart Association es menor a los 150 minutos por semana (Haskell et al., 2007).

Un estudio que comparó la dieta por sí sola, la actividad física por sí sola, y la actividad física combinada con la dieta concluyó que la pérdida de peso conseguida en el grupo físicamente activo fue significativamente menor a la que se logró en el grupo que sólo tenía dieta, y que el grupo que realizó dieta y ejercicio tuvo la mayor pérdida de peso detectada comparada con los demás grupos (Shaw et al., 2006).

El objetivo del ejercicio para la disminución de peso es perder una cierta cantidad de calorías totales por semana, más que alcanzar un cierto umbral de actividad física intensa. Esto se puede lograr realizando ejercicio en sesiones cortas, pero de manera frecuente, sobre todo en aquellos pacientes en los que las condiciones físicas limitan la realización de ejercicios por tiempo prolongado.

Diversos estudios han respaldado que el ejercicio aeróbico moderado a una intensidad entre el 60 y 70 % de la frecuencia cardíaca máxima (FC MAX), promueve el consumo de ácidos grasos de manera selectiva [Salas-Salvadó (Grupo Colaborativo de la SEEDO) et al., 2007; Robles et al., 2004]; por esto el ejercicio aeróbico bajo esos parámetros es el más recomendado como tratamiento de elección en personas con sobrepeso, obesidad grado I y obesidad grado II, exceptuando por supuesto a personas con cardiopatías o personas que pudieran tener riesgo articular u óseo.

- Efectos de ejercicio sobre el perfil bioquímico de salud cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares representan un problema de salud importante a nivel mundial. La evidencia actual apoya que la obesidad aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades crónicas tales como la diabetes, solo por citar un ejemplo. El desarrollo de la obesidad relacionada con complicaciones depende de la cantidad y distribución de la grasa corporal y su función endocrina (Gnacińska et al., 2009).

La Sociedad Americana de Cardiología ha establecido que la obesidad es el principal factor modificable de riesgo para enfermedades cardíacas. Se ha reportado que, por cada minuto de incremento en el tiempo en la banda de esfuerzo, aproximadamente equivale a 1 MET (Unidad que traduce un equivalente metabólico) se puede disminuir el riesgo de morir por enfermedad cardíaca en un 8%.

Muchos estudios se han centrado en mejorar los perfiles de lípidos (como uno de los factores de riesgo más importantes de enfermedades crónicas) mediante la planificación de una dieta y ejercicio (Nounou et al., 2012).

- Programas de entrenamiento como tratamiento a la obesidad

Un programa de entrenamiento es el conjunto de objetivos contenidos, medios y métodos, que practicados sistemáticamente mejoran nuestra condición física consiguiendo adaptaciones significativas en cada uno de nuestros sistemas. El entrenamiento nos permite mejorar nuestro estado general de salud tanto física como mental, mejorando nuestra calidad de vida.

Se debe diseñar un programa de ejercicio específico de acuerdo a las condiciones físicas de cada persona ya que existen diferentes cambios a través de los cuales la intensidad del ejercicio puede modificar el balance energético:

- a. Aumentando el gasto energético durante el ejercicio (El gasto energético aumenta a medida que aumenta la intensidad del ejercicio).
- b. Aumentando el gasto energético después del ejercicio.
- c. Disminuyendo el consumo energético después del ejercicio.

Un estudio muestra que el aumento del gasto energético durante el ejercicio varía al aumentar la intensidad del mismo, al producirse un mayor estímulo hay alteraciones en el

metabolismo energético y graso; se observó que una actividad física moderada (50% VO² max) realizada 2-3 veces por semana, 20 a 30 minutos por sesión, representaba una actividad compatible con un adecuado entrenamiento para incrementar la salud del sujeto obeso. En personas obesas sin problemas cardiopulmonares ni músculo esqueléticos, se recomiendan ejercicios de intensidad moderada (60-70% de FC MAX) ya que esto promueve el consumo de ácidos grasos de manera selectiva [Salas-Salvadó (Grupo Colaborativo de la SEEDO) et al., 2007; Robles et al., 2004], o bien de alta intensidad (70-75% VO₂ max.) siempre bajo supervisión adecuada (Leermakers et al., 2000).

- Prueba de esfuerzo

La prueba de esfuerzo (PE) convencional o electrocardiográfica es un procedimiento ampliamente usado en la valoración diagnóstica y pronóstica de los pacientes con alguna cardiopatía. Es utilizada en sujetos, sanos (sedentarios, atletas, discapacitados) y enfermos con cardiopatías diferentes de la isquémica (insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, cardiopatías congénitas, etc.) con sus respectivas adecuaciones para estos últimos.

En el presente estudio se diseñó una prueba de esfuerzo basándose en el protocolo de Bruce (ver tabla 2).

Estadio	Tiempo	Velocidad (Km/hr)	Velocidad (Mph)	Gradiente de inclinación
1	3 Min	2.74	1.7	10%
2	3 Min	4.02	2.5	12%
3	3 Min	5.47	3.4	14%
4	3 Min	6.76	4.2	16%
5	3 Min	8.05	5.0	18%
6	3 Min	8.85	5.5	20%
7	3 Min	9.65	6.0	22%
8	3 Min	10.46	6.5	24%
9	3 Min	11.26	7.0	26%
10	3 Min	12.07	7.5	28%

Tabla 2.- Protocolo de Bruce (tomado del libro “Manual de Enfermería en Arritmias y Electrofisiología)” de Rodríguez Morales María de las Mercedes y Colaboradores, ISBN 978-84-616-4047-8).

La Prueba de Bruce es la prueba de esfuerzo mayormente utilizada; ésta se realiza en una banda sin fin (caminadora o treadmill en inglés). Fue desarrollada como una prueba clínica para evaluar a pacientes con sospecha de enfermedad coronaria, aunque también se puede utilizar para estimar la aptitud cardiovascular.

El ejercicio se realiza en una caminadora la cual inicia a una velocidad de 2,74 Km/h (1.7 mph) y en un gradiente de inclinación del 10%. La velocidad e inclinación se realizan por intervalos de tres minutos; en cada intervalo la inclinación de la cinta de correr aumenta un 2% y la velocidad aumenta de manera variable como se mostró en la tabla 2.

Al modificar la prueba de Bruce generamos la siguiente prueba de esfuerzo (ver tabla 3).

- Protocolos de entrenamiento

El protocolo de entrenamiento más utilizado es el protocolo de Bruce, sin embargo, no es el único ni necesariamente el más efectivo; por esto es importante tomar en cuenta las características específicas de cada individuo y/o grupo de estudio y poder modificarla, combinarla con otra, todo de acuerdo al interés de estudio; por ejemplo, modificando el protocolo de Bruce según los intereses del estudio. Actualmente existen diversos protocolos de entrenamiento, como por ejemplo el de Naughton o el de Hashimoto-Sayuki los cuales también son ampliamente utilizados en la actualidad. Para este estudio concretamente se empleó una versión modificada del protocolo de entrenamiento de Hashimoto-Sayuki (ver tabla 4 y 5).

Periodo/ Estadio	% Inclinación	Inclinación / equipo	Velocidad millas (mph)	Velocidad kilómetros (Km/h)	Tiempo (min)
½	0	0	1.4	2.3	3
1	5	1	1.7	2.7	6
1 ½	10	2	2.1	3.4	9
2	10	2	2.5	4	12
2 ½	12	2	2.9	4.7	15
3	12	2	3.4	5.5	18
3 ½	14	2	3.8	6.1	21
4	14	2	4.2	6.8	24
4 ½	16	2	4.6	7.4	27
5	16	2	5	8	30

Tabla 3.- Prueba de esfuerzo basada en el protocolo de Bruce modificado.

Etapa	Velocidad	Tiempo
Calentamiento	2.2 mph	3 min
1	2.4 mph	3 min
2	2.6 mph	3 min
3	2.8 mph	3 min
4	3 mph	3 min
5	3 mph	3 min
6	3.1 mph	3min
7	3.3 mph	3 min
8	3.4 mph	3 min
9	3.5 mph	3 min

Tabla 4.- Protocolo de entrenamiento de Hashimoto-Sayuki.

Etapa	Velocidad (mph)	Tiempo a X velocidad	Tiempo transcurrido
Calentamiento	2.3	3 min	0-3 min
1	2.5	3 min	3-6 min
2	2.7	3 min	6-9 min
3	2.9	3 min	9-12 min
4	3	3 min	12-15 min
5	3.2	3 min	15-18 min
6	3.4	3min	18- 21 min
7	3.6	3 min	21-24 min
8	3.8	3 min	24-27 min
9	4	3 min	27- 30 min
10	4.1	3 min	30-33 min
11	4.2	3 min	33-36 min
12	4.3	3 min	36-39 min
13	4.5	3 min	39-42 min
Enfriamiento	2.3	3 min	42-45 min

Tabla 5.- Protocolo de entrenamiento de Hashimoto-Sayuki modificado.

Dieta.

Se denomina dieta al conjunto de alimentos que una persona consume cada día.

- Dietoterapia aplicable en condiciones de sobrepeso y obesidad

Los propósitos de la dietoterapia en condiciones de obesidad son bastante conocidos y, en apariencia, muy fáciles de lograr. Lo que se pretende conseguir es la suficiencia nutricional, adhesión al tratamiento dietético y estilo de alimentación saludable, pero, el gran desafío consiste en la manera de lograrlo. De lo anterior se puede derivar distintos objetivos:

- Conseguir un balance energético negativo
- Evitar el desbalance nutricional
- Aportar un valor de saciedad adecuado
- Modificar conductas alimentarias erradas

- Considerar hábitos, gustos y poder adquisitivo
- Educar al paciente.

El tratamiento no farmacológico de la obesidad implica modificaciones dietéticas, la realización de actividad física y en ocasiones una intervención conductual y/o psicológica.

La dieta ideal es aquella dieta equilibrada, en la que el balance energético y el ejercicio físico se encuentran contemplados para mantener un peso corporal adecuado. Una dieta que cree un déficit de 500-1000 kcal/día es la más adecuada a aplicar en personas obesas en las que se pretende conseguir una pérdida de peso de 1/2 a 1 kg a la semana (nivel de evidencia 1) y llegar a una pérdida ponderal inicial del 8-10% en 6 meses [Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults (NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Obesity in Adults (US)). Bethesda NIH Expert Panel 1998]. La restricción calórica no debería ser inferior a 1000-1200 kcal/día en la mujer e inferior a 1200-1600 en el varón [Salas-Salvadó (Grupo Colaborativo de la SEEDO) et al., 2007].

¿Cómo se integran al tratamiento de la obesidad a los receptores?

En condiciones de obesidad se genera una excesiva liberación de ácidos grasos libres (FFAs) así como una alta liberación de DNA uncatenario endógeno (cfDNA). TLR2 y TLR4 particularmente censan FFAs, mientras que TLR9 censa DNA uncatenario. El reconocimiento por los TLRs promueve la producción de citocinas proinflamatorias lo que finalmente desencadena en metainflamación (Bullo et al., 2006; Shi et al., 2006; Davis et al., 2008; Kim et al., 2012; Nishimoto et al., 2016; Nguyen et al., 2007). Por lo tanto es relevante estudiar los receptores TLRs, a continuación se describirán a detalle.

Los receptores tipo Toll (TLRs).

Los receptores tipo Toll (Toll Like Receptors o TLRs) son una familia de receptores celulares que se localizan tanto en la membrana (transmembranales) como en el interior

de las células, específicamente de manera trans-endosomal (los cuales son específicamente TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9). Éstos receptores se encuentran principalmente en células de mucosas, sin embargo también se localizan en diversos tipos celulares repartidos dentro del organismo como son; células epiteliales del intestino, linfocitos ubicados entre las células epiteliales, células de mesénquima subepitelial, macrófagos y células dendríticas (Cook et al., 2004). Es importante recalcar que los TLRs son uno de los principales mecanismos de reconocimiento de patógenos que activan el sistema inmune innato; éstos reconocen a los patógenos mediante un sistema de detección el cual consiste en censar sustancias secretadas por los microorganismos agresores, o bien reconocer moléculas clave componentes de estructuras propias de los patógenos (Inmunología Celular y Molecular. Abbas, 2004; Akira et al., 2004, Kawai et al., 2006).

Los TLRs, a pesar de no ser altamente específicos, interactúan con los patógenos dependiendo del tipo o la clase de agente infeccioso, esto lo realizan mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); de manera que los PAMPs vía TLRs activan la respuesta inmune innata (Cook et al., 2004; Sánchez et al., 2004; Bautista et al., 2005; Lai et al., 2008).

La estructura de los TLRs consta de un dominio de 200 aminoácidos altamente conservado en la región citoplásmica conocido como Toll/IL-1R (TIR) (el “IL-1” proviene de que también los miembros de la familia de receptores de interleucina-1 cuentan con ese dominio), y por esto se clasifican dentro de la gran superfamilia TIR; este dominio se caracteriza por la presencia de 3 regiones altamente homólogas (conocidas como caja 1, caja 2 y caja 3), que son cruciales en la señalización río abajo que se desprende de la activación de los TLRs. También cuentan con una prolongación en la porción extracelular la cual consta de repeticiones en tandem de regiones ricas en leucina (LRRs) (Cook et al., 2004; Akira et al., 2004) (Figura 8).

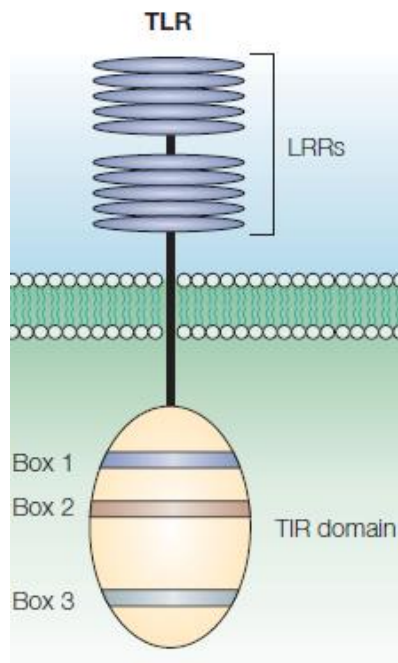


Figura 8. Estructura básica de los receptores TLRs (tomado parcialmente de Akira et al., 2004).

Todos los miembros de la superfamilia TIR incluidos los TLRs además de tener un dominio de gran semejanza estructural cuentan con mecanismos de transducción semejantes con mediadores secundarios comunes. Los TLRs se catalogan por número dependiendo del tipo de sustancia y/o componente molecular del organismo patógeno que reconocen, es decir, según el PAMP que identifiquen; los PAMPs pueden ser productos microbianos tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, flagelina, motivos de DNA bacterianos como por ejemplo sitios CpG (Figura 9 y tabla 6). Los diversos TLRs producen distintos patrones de expresión río abajo al ser activados con su ligando natural, los patrones de expresión pueden ser dependientes de la molécula MYD o independientes a esta. Todos los TLRs se activan formando dímeros, algunos actúan como homodímeros y otros en forma de heterodímeros (Akira et al., 2004; Bautista et al., 2005).

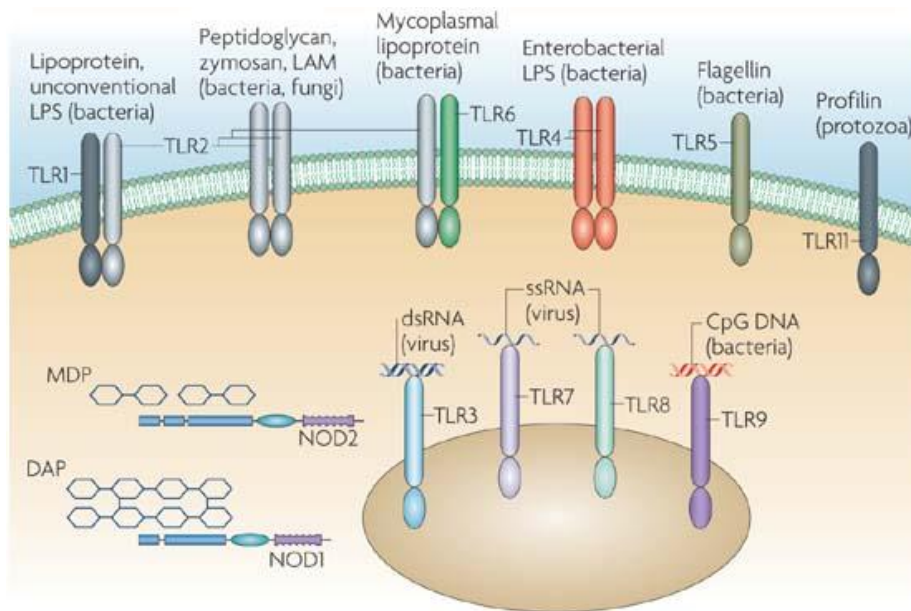


Figura 9. Receptores TLR y sus ligandos en humano (tomado de Kaufmann et al., 2007).

Se han descrito trece tipos diferentes de TLRs; los TLRs del 1 al 10 se encuentran tanto en humano como en el ratón, mientras que TLR11, TLR11/12 y TLR13 sólo se han observado en ratón; aunque algunos autores proponen que TLR10 es un pseudogene (Kawai et. Al 2006). Prácticamente los 13 TLRs que se conocen (Figura 9) brindan protección contra la mayoría de los patógenos a nivel de sistema inmune innato. El amplio rango de reconocimiento que tienen los TLRs se debe también a la habilidad que tienen de formar heterodímeros entre las diferentes clases de TLRs; por ejemplo, dímeros como TLR2-TLR6 reconocen y responden a las lipoproteínas diacetiladas mientras que, un homodímero de un receptor tiene una actividad distinta; otro ejemplo es el que se da por la interacción de TLR2 y TLR1 la cual resulta en un efectivo reconocimiento de las lipoproteínas triacetiladas (Kawai et al., 2006).

Receptor	Ligando	Origen del ligando
TLR1	Triacyl lipopéptidos	Bacteria y mycobacteria
	Factores solubles	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopéptidos	Diversos patógenos
	Peptidoglicanos	Bacterias gram positivas
	Acido lipotenoico	Bacterias gram positivas
	Lipoarabinomanano	Mycobacteria
	Fenol-soluble modulina	<i>Staphylococcus epidemidis</i>
	Glicoinositolfosfolipidos	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glucolípidos	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porinas	<i>Neisseria</i>
	Lipopolisacáridos atípicos	<i>Leptospira interrogans</i>
	Lipopolisacáridos atípicos	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	Zymosan	Hongos
HSP70	Huesped	
TLR3	RNA de doble cadena	Virus
TLR4	Lipopolisacáridos	
	Lipopolisacáridos atípicos	Bacterias gram negativas
	Taxol	Plantas
	Proteínas de fusión	Virus sincicial respiratorio
	Proteínas de cubierta	Virus tumor-mamario en ratón
	HSP60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	HSP70	Origen de el ligando huésped
	Secuencias repetidas del extra dominio A de fibronectina del tipo 3	Huésped
TLR5	Flagelina	Bacterias
TLR6	Diacil lipopéptidos	<i>Mycoplasma</i>
	Acido lipotenoico	Bacterias gram positivas
	Zymosan	Hongos
TLR7	Imidazoquinolina	Compuestos sintéticos
	Loxorina	Compuestos sintéticos
	Bropirimina	Compuestos sintéticos
	RNA de cadena sencilla	Virus
TLR8	Imidazoquinolina	Compuestos sintéticos
	RNA de cadena sencilla	Virus
TLR9	CpG contenido en DNA	Bacteria y virus
TLR10	No descrito	No descrito
TLR11	No descrito	Bacteria uropatogénica

Tabla 6. Los receptores TLR su reconocimiento y su ligando (tomado parcialmente de Akira et. Al 2004 y de Kawai et al., 2006).

El descubrimiento de los TLRs comenzó cuando un grupo alemán descubrió unos receptores en la mosca *Drosophila*, este grupo observó que funcionaban como un método de defensa contra las infecciones por hongos y los llamo receptores TOLL. Más tarde en el año 1997 cuando R. Medzhitov y C. Janeway de la Universidad de Yale reconocieron unos receptores similares pero esta vez en células de humanos, por los que los llamaron receptores tipo Toll (TLRs).

El Doctor Shizuo Akira de la Universidad de Osaka en Japón, en un estudio que realizó en ratas genéticamente modificadas pudo demostrar que si se bloquea alguna de las señales proteicas intermedias (citocinas) en la señalización de los TLRs, el TLR no tiene respuesta a la detección del producto microbiano o patógeno en cuestión, lo que sugiere que las proteínas asociadas al TLR podrían ser un buen blanco para buscar terapias antiinflamatorias o inmunoreguladoras (Akira et. Al 2004).

La maduración de las células dendríticas (DC) o células presentadoras de antígeno profesionales, puede o no ser dependiente de la activación de los TLRs.

Estudios con varios TLRs demuestran que éstos activan la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B), este factor de transcripción regula la expresión de citocinas a través de varias moléculas incluyendo la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88), el adaptador de dominio contenedor de la proteína TIR (TIR TIRAP/Mai) y el adaptador del contenedor de dominio de TIR inducido por IFN β (TRIF). La activación de la vía del NF- κ B conduce a la iniciación de la respuesta adaptativa inmune ya que promueve la producción de citocinas proinflamatorias tales como la interleucina 1 y 8 (IL-1, IL-8), factor de necrosis tumoral α (TNF- α , IL-12), y la inducción de moléculas de coestimulación, tales como la CD80, CD86 y CD40 (Akira et. al., 2004).

Gracias a los conocimientos actuales que se tienen sobre la señalización promovida por la activación de los TLRs, ahora se pueden manipular parcialmente las respuestas dependientes de éstos y así bloquear o disminuir los estragos generados por enfermedades autoinmunes o dependientes de una señalización defectuosa TLR dependiente. El reconocimiento que logran los TLRs es muy variado; éste opera mediante las diversas combinaciones que pueden existir entre los 13 TLRs (Akira et. al., 2004; Takeda et al., 2003). Las interacciones más estudiadas son:

TLR1: Cuando TLR1 coopera con TLR2 ambos se unen a peptidoglicanos bacterianos; lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias gram positivas, así como a lipopéptidos micoplasmáticos; TLR1 reconoce la lipoproteína de la superficie externa (OspA) de la *espiroqueta Borrelia burgdorferi*.

TLR2: Es fundamental para el reconocimiento de una variedad de PAMPs entre los que destacan las lipoproteínas microbianas (por ejemplo, el ácido lipoico); los lipopéptidos bacterianos, los peptidoglicanos (PGN). TLR2 se asocia con TLR1 para formar heterodímeros, aunque no se conoce el ligando para el par TLR2/TLR1; esta unión provoca la activación de señales intracelulares, principalmente hacia la transferencia de un factor de transcripción, el κ B (NF κ B).

TLR3: Reconoce el ácido ribonucleico (RNA) de doble cadena (dsRNA) viral; en humanos TLR3 se expresa únicamente en células dendríticas mieloides.

TLR4: Fue el primer receptor descrito; induce la expresión de genes de diversas citocinas inflamatorias y de varias moléculas de estimulación; reconoce lipopolisacáridos (LPS), los cuales son glucolípidos que se encuentran específicamente en las paredes celulares de

las bacterias gram-negativas. Se ha observado que TLR4 reconoce algunas proteínas de shock térmico (HSP) entre las cuales figura la HSP60; también se conoce que la activación de células dendríticas por ácido hialurónico está mediada por TLR4, además tiene la capacidad de reconocer algunos fibrinógenos que inducen la producción de quimiocinas (mediada por patógenos).

TLR5: Reconoce la flagelina la cual es la proteína que conforma los cilios de las bacterias; esto se identificó inicialmente mediante su interacción con la bacteria *Listeria monocytogenes*.

TLR6: Se une al zymosan producido por los hongos, también reconoce peptidoglicanos bacterianos. Cuando TLR6 se asocia con TLR2 estos reconocen lipopéptidos micoplasmáticos y lipoproteínas diacetiladas.

TLR7: Se une a una sola hebra del RNA viral por ejemplo la cadena sencilla resultante del virus de inmunodeficiencia humana del tipo1 (VIH-1); TLR7 también reconoce el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la influenza; además reconoce ciertos RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), las imidazoquinolinas (producto sintético); y algunos análogos de guanosina como es el caso de loxoribina y bropirimina.

TLR8: Se une también al RNA viral de cadena sencilla (ssRNA) y también reconoce las imidazoquinolinas.

TLR9: Se une a sitios CpG dentro del DNA no metilado que se encuentra en bacterias y virus también reconoce el pigmento de la malaria (la hemozoina).

TLR10: Está filogenéticamente relacionado con el TLR1 y TLR6. Se desconoce cuál es el ligando de este receptor que se expresa preferentemente en linfocitos B de tejidos inmunitarios, como bazo, nódulos linfáticos y timo.

TLR11: Reconoce componentes de bacterias uropatógenas y también una molécula del tipo “profilin-like” que se encuentra en un protozoo parásito; el *Toxoplasma gondii*.

- Proceso de interacción de los TLRs con los patógenos.

Cuando los TLRs, ubicados en la superficie de las células patrulleras (dendríticas y macrófagos) reconocen al agresor, desencadenan una cascada de señalización; éste proceso se explicará a continuación (Takeda et al., 2003; Bautista et al., 2005):

Cuando un receptor TLR se une a su ligando en el interior celular se pone en marcha todo un mecanismo de ataque en el cual se comienzan a producir una gama de citocinas (proteínas mensajeras y de señalización) en el siguiente orden.

- a) Ya producidas las citocinas, éstas son arrojadas al torrente circulatorio, en el torrente éstas reclutan macrófagos y células dendríticas, además de otras células inmunológicas; todo este agregado celular forma un complejo que es extremadamente eficiente para atacar al microorganismo o patógeno en cuestión.
- b) Al mismo tiempo estas citocinas son liberadas por las células antes mencionadas, todo el conjunto de procesos produce los síntomas clásicos de infección entre los cuales se incluyen la fiebre y síntomas característicos que se observan por liberación de histaminas.

- c) Posterior al ataque producido por el sistema inmune, los macrófagos y las células dendríticas que han despedazado al patógeno, colocan fragmentos de éste en su superficie, indicando que está presente un agente causal de enfermedad; mediante este proceso de exhibición se activan a los linfocitos B y los linfocitos T (componentes importantes en la respuesta del sistema inmune adaptativo); y estos inician el ataque contra el invasor de manera específica (Bautista et al., 2005; Inmunología Celular y Molecular. Abbas, 2004).

Es importante recalcar que la señalización promovida por los TLRs compromete o recluta a los linfocitos B y los linfocitos T; sin esta interacción el organismo es incapaz de desarrollar una respuesta inmune total; además, sin esta interacción el sistema inmune carecería de la capacidad de generar memoria contra las infecciones (Figura 10).

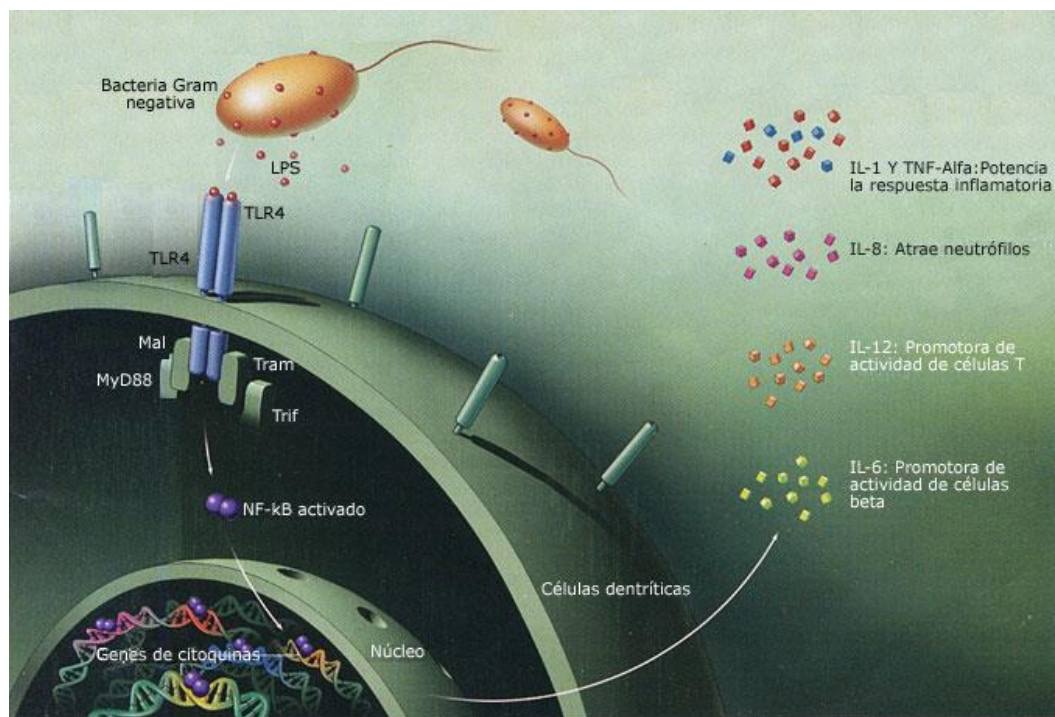


Figura 10. Unión de un patógeno a los TLRs y producción de citocinas como respuesta (cascadas de señalización) (Luke A. J. O'Neill et al., 2005).

- Señalización MyD dependiente y MyD independiente post activación de los TLRs.

La especificidad de los TLRs se ve fuertemente influenciada por varias proteínas adaptadoras como MD-2 y CD-14 las cuales en ocasiones forman un complejo con el TLR4 en respuesta a los LPS (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

La señalización de los TLRs consiste al menos en dos vías distintas; MyD88 dependiente la cual finaliza en la producción de citocinas proinflamatorias o bien MyD88 independiente el cual se asocia a la estimulación de IFN- β y a la maduración de células dendríticas (cruciales en “la memoria” que se genera en el sistema inmune) (Akira et. al., 2004).

La señalización dependiente de MyD88 es el camino más usual que suelen seguir todos los TLRs. Se inicia generalmente cuando los TLRs reclutan a la proteína adaptadora MyD88 vía la TIR; posteriormente TIR activa a IRAK-1 fosforándola. Mientras dura el complejo MYD88-TLR, IRAK-1 se asocia temporalmente con TRAF6; mediante esta última asociación se da la activación de NF- κ B que a su vez activa la producción de proteínas proinflamatorias como TNF α , IL-1 y IL-12 (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

A nivel intracelular la señalización comienza con la unión del dominio intracelular de los TLRs, llamado TIR (Toll/IL-1 receptor homology domain) a una cinasa asociada, IRAK (IL-1 receptor-associated kinase); este proceso requiere dos proteínas de adaptación, la MyD88 (myeloid differentiation protein 88) y TIRAP (TIR domain containing adapter protein), llamada también Mal (MyD88-adapter-like protein). El proceso de señalización intracelular puede inhibirse por una la unión de una tercera proteína llamada Tollip (Toll-

interacting protein) (Akira et al., 2004; Kawai et al., 2006). La señalización MyD88 dependiente se da de la siguiente manera (figura 11):

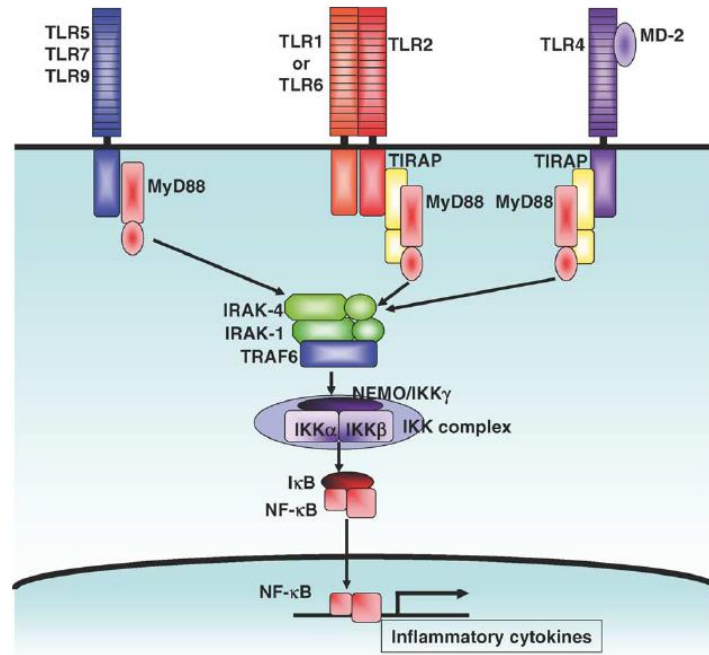


Figura 11. Vía de señalización dependiente de la proteína adaptadora MyD88 (tomado de Takeda et al., 2004).

Posterior a la unión MyD88 - TIRAP se produce un proceso de fosforilación que promueve una asociación con la proteína IRAK-4; ésta se asocia nuevamente con otra proteína, la TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor-6) esta unión activa a la cinasa MAP3K (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) por ubiquitinación así como a la TAK1 (TLR1 transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase); posteriormente mediante una fosforilación TAK1 activa el complejo, IKK (inhibitor KB kinase) lo cual promueve que se disocie y libere sus dímeros IKK α e IKK β ; posterior a la liberación de sus dímeros se da una fosforilación lo cual transforma uno de los dímeros, a IKK a I κ B. I κ B se une en un complejo dimérico con NF- κ B y provoca una proteólisis que libera las moléculas NF- κ B y las activa. NF- κ B se trasloca al núcleo donde se hace

activa lo que promueve la traducción, transcripción y producción de un ARNm (mensajero); estos procesos inducen también la producción de citocinas y otras moléculas efectoras como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 y IL-12 o $\text{IFN}\beta$ (Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006; Takeda et. al., 2004).

Los LPS bacterianos por si solos son capaces de activar la vía $\text{NF}\kappa\text{B}$ y las MAP cinasas.

La señalización MyD88 independiente sigue los siguientes pasos (figura 12):

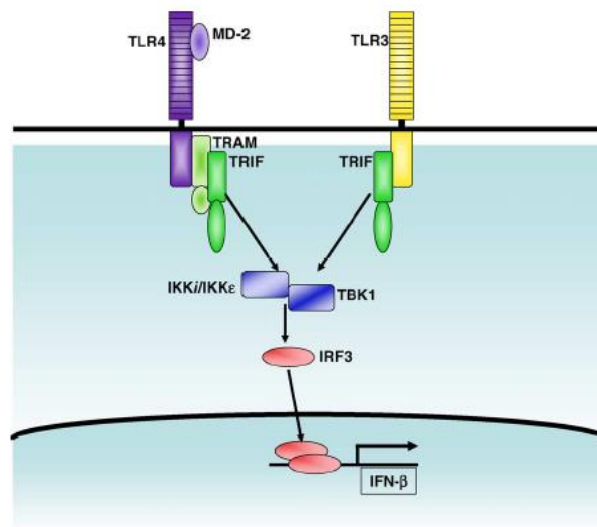


Figura 12. Vía de señalización independiente de la proteína adaptadora MyD88; inducida generalmente por LPS (tomado de Takeda et. al., 2004).

Los LPS hacen contacto los receptores TLR4 o TLR3 de macrófagos, esto provoca la activación de TRAM (TRIF-related adaptor molecule), ésta se une con TRIF; unidos; ambos se adhieren a un complejo trimérico atípico de IKKs formado $\text{IKK}\alpha/\text{IKK}\epsilon$ y TBK1; esta unión promueve la activación de IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) el cual posteriormente se trasloca al núcleo y activa la traducción, transcripción y producción de

citocinas y otras moléculas efectoras principalmente IFN β (Akira et. al., 2004; Takeda et. al., 2003).

- Ubicación cromosómica de la familia de los genes TLR 's.

Cromosómicamente los genes que codifican para los TLRs en humano se ubican de la siguiente manera (Takeda et al., 2003):

- TLR1 y TLR6, alrededor de 4p14.
- TLR2 y TLR3, entre 4q32 y 4q35 respectivamente.
- TLR4 y TLR5, entre 9q32-33 y 1q33.3 respectivamente.
- TLR7 y TLR8, en tándem en Xp22.
- TLR9 en 3p21.3

TLR1 y TLR6 tienen estructuras genómicas muy similares y se diferencian por un exón ubicado en forma de tándem en el mismo cromosoma; se propone que uno de ellos es producto de una duplicación a lo largo de la evolución del otro (Takeda et al., 2003) (figura 13).

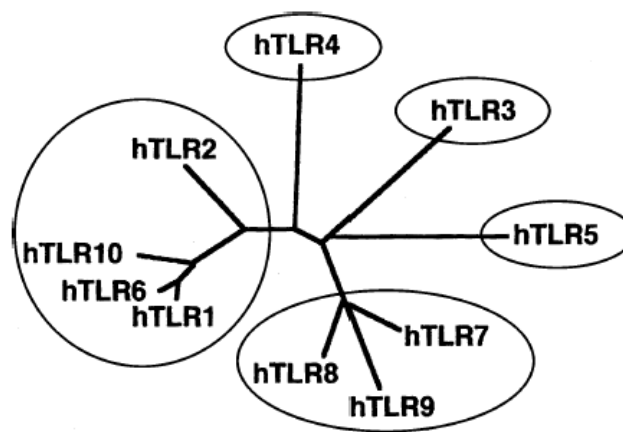


Figura 13. Árbol filogenético humano de los TLRs; este árbol fue construido por alineamiento de secuencias de aminoácidos usando el método de similitud (tomado de Takeda et al., 2003).

- Relación del sobrepeso y la obesidad con los genes TLR2, TLR4 y TLR9.

La obesidad tiene una correlación positiva con el aumento de marcadores inflamatorios (Ziccardi et al., 2002), el acúmulo de grasa conlleva a un estado proinflamatorio conocido como metainflamación el cual se caracteriza por un aumento en la producción de citocinas inflamatorias circulantes como IL6, IL8, el TNF α , la haptoglobina, la elevación de la proteína C reactiva, VCAM-1, entre otras (Caballero et al., 2003; Esposito et al., 2003; Fantuzzi et al., 2005).

Las producción de citocinas proinflamatorias favorecen la adhesión, migración y acúmulo de los monocitos y linfocitos en la pared vascular lo que puede promover la formación de una placa aterosclerótica y el desarrollo posterior de la enfermedad cardiovascular (Martínez-González et al., 2001). Entre las citosinas proinflamatorias que se producen como consecuencia de la obesidad destacan tres: el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleucina 6 (IL6) y la adiponectina. Está ampliamente tipificado que TNF α se encuentra elevado en sujetos obesos y es un detonante de patologías como el síndrome metabólico. La IL6 se asocia a la dislipidemia del síndrome metabólico (Fernández-Real et al., 2000); se ha establecido que a mayor masa grasa se detectan mayores concentraciones de IL6 a nivel sistémico (Fantuzzi et al., 2005).

El tejido adiposo es un tejido termogénico y endócrino que desata una señalización de mensajeros (citocinas); en condiciones de obesidad promueve una excesiva liberación de ácidos grasos libres (Bullo et al., 2006); TLR2, TLR4 y TLR9 juegan un papel crucial en el desarrollo de la metainflamación ya que la activación de éstos ya sea por ácidos grasos libres o bien por DNA unicitenario endógeno genera la producción de citocinas proinflamatorias (Shi et al., 2006; Davis et al., 2008; Kim et al., 2012; Nishimoto et al., 2016; Nguyen et al., 2007).

TLR-2 Reconoce lipopéptidos y lipoproteínas de bacterias Gram positivas, así como LPS de algunas no-enterobacterias como *Helicobacter pylori*. TLR-2 también puede formar dímeros heterofílicos con otros TLRs por ejemplo con TLR6 y generar así el dímero TLR6/TLR2 que reconoce péptidos diacilados; otro ejemplo es el dímero TLR1/TLR2 que reconoce lipopéptidos triacilados (Akira et. al., 2004; Takeda et al., 2003). Kim en el 2010 presentó uno de los estudios pioneros en roedores en el cual se relaciona la obesidad como componente inductor de la expresión de TLRs (Kim et al., 2010); más tarde otros estudios realizados en humanos asocian la relación de ácidos grasos libres (FFAs) con la inducción de la expresión de TLR2 y TLR4; el estudio de Yin del 2014 indica que los FFAs producidos de manera endógena funcionan directamente como ligandos de estos TLRs; esta asociación resolvería en gran medida la explicación del porqué la obesidad cuenta con un componente inflamatorio sistémico (metainflamación) ya que en condiciones de obesidad se encuentra ampliamente descrito que existe una gran cantidad de FFAs en el medio extracelular (Yin et al., 2014).

TLR-4 por su parte reconoce lipopolisacáridos (LPS) provenientes de bacterias Gram-negativas en asociación con moléculas accesorias como CD14 y MD-2. También censa moléculas endógenas como el dominio A de fibronectina y las proteínas de choque térmico (HSP) HSP60 y HSP70 (Akira et. al., 2004; Takeda et al., 2003); TLR4 también induce su expresión por estimulación FFAs (Yin et al., 2014, Sánchez et al., 2004; Cook et al. 2004; Akira and Kawai 2004).

TLR9 también promueve metainflamación; sin embargo lo hace censando el DNA celular libre (cfDNA); varios estudios habían indicado indirectamente que, en condiciones de obesidad existía un alta liberación de cfDNA, pero no fue hasta el 2015 que Tug explicó el fenómeno y acuñó este término que se estableció que este cfDNA funge como ligando endógeno de TLR9 (Tug, et al., 2015; Nishimoto et al., 2016).

Metilación en la región del promotor de los genes.

La metilación del DNA es la unión de grupos metilo a secuencias CpG dentro del DNA; esta unión de un grupo metilo resulta relevante cuando se presenta la región de promotor de los genes, ya que en ocasiones bloquea los sitios de unión de factores transcripcionales. Estímulos medioambientales como por ejemplo la dieta y/o el ejercicio promueven la expresión de los genes que codifican para las DNMT3As y DNMT3Bs, las cuales son las encargadas de inducir metilación “*de novo*”; de manera que estímulos como dieta y/o el ejercicio promueven el silenciamiento génico por metilación en regiones promotoras de genes (Kim et al., 2009; Rakyan et al., 2001; Rönn et al., 2013; García et al., 2012, Goll et al., 2005; Klose et al., 2006, Ling et al 2014, Klose et al., 2006; Barrès et al., 2012).

- Metilación en la región del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9.

La metilación de las regiones de promotor de TLR2, TLR4 y TLR9 es un mecanismo muy importante en el silenciamiento de estos genes; como se ha comentado a lo largo de este escrito, la dieta y el ejercicio son mecanismos que promueven metilación en estos genes por ende la expresión de estos genes se ven disminuida como respuesta a estos estímulos. En resumen; la metainflamación producida por TLR2, TLR4 y/o TLR9 se ve disminuida por los estímulos de dieta y/o ejercicio (Kim et al., 2009; Rakyan et al., 2001; Rönn et al., 2013; García et al., 2012, Goll et al., 2005; Klose et al., 2006, Ling et al 2014, Klose et al., 2006; Barrès et al., 2012, Akira et. al., 2004; Kawai et al., 2006).

miRNAs asociados al silenciamiento de TLR2, TLR4 y TLR9.

Los miRNAs regulan la síntesis de proteínas uniéndose a la región UTR codificante de los RNA mensajeros (mRNA's) con lo que provocan silenciamiento de la expresión génica en genes clave. En la actualidad se han identificado alrededor de 206 miRNAs (Mello et al., 2014; He et al., 2014); en los últimos cinco años se ha descrito que éstos son

fuertes reguladores o incluso silenciadores de los TLRs; en el caso de TLR2, TLR4 y TLR9 existen múltiples miRNAs que regulan la expresión de los mismos ya sea a nivel de bloqueo de los mRNA que codifican a las proteínas que conforman los receptores TLRs o bien a nivel de los mRNA que codifican a las proteínas que se encuentran río abajo en las vías de señalización que desencadenan las respuestas de los TLRs.

Se ha descrito que miRNA 146a, miRNA 155 y miRNA 223 inhiben los mRNAs que codifican a las proteínas que conforman a los receptores de TLR2 y TLR4. También se ha descrito que miRNA 155 y miRNA 223 inhiben el mRNA que codifica a la proteína que conforma al receptor de TLR9. Por último se ha descrito que los miRNAs: 21, 146a, 155 y 223 inhiben a los mRNA que codifican a las proteínas que se encuentran río abajo en las vías de señalización que desencadenan las respuestas de los TLRs (Carthew et al., 2010; Müller et al., 2007; Benetti et al., 2008; Sinkkonen et al., 2008; Hu et al., 2014; He et al., 2014; Valadkhan et al., 2013, Matera et al., 2014, Guo et al., 2014;)(ver tabla 7); esta inhibición se da específicamente de la siguiente manera:

- miRNA 146a inhibe los mRNAs de los genes que codifican para las proteínas: IRAK4, IRAK1, IRAK2, TRAF6, MyD88, C/EBP β , RANTES y Notch1.
- miRNA 155 inhibe los mRNAs de los genes que codifican para las proteínas: MyD88, FADD, IKK β , IKK ϵ , TAB2, RIPK1, P38, MAPK, C/EBP β , FOXP3; Ets2, TNF, SHIP1, SOCS1.
- miRNA 223 inhibe el mRNA del gen que codifica para la proteína STAT3.
- miRNA 21 inhibe los mRNAs de los genes que codifican para las proteínas: IRAK, MyD88, IL-12p35, IFN- γ , L-12p40, PDCD4.

Target mRNA	miRNA(s)	Reference
Receptors		
TLR4	let-7i, let-7e, miR-223, miR-146a, miR-146b, miR-511	[25, 53, 62, 72, 78, 79]
TLR3	miR-223, miR-26a	[53, 80]
TLR2	miR-105, miR-19a/b, miR-143, miR-146a	[81-84]
Signalling proteins		
IRAK1	miR-146a, miR-146b, miR-21	[19, 26, 28, 31, 85]
TRAF6	miR-146a, miR-146b	[19, 26, 79]
IRAK2	miR-146a	[19, 26]
MyD88	miR-146b, miR-155, miR-200b, miR-200c, miR-21, miR-149, miR-203	[29, 30, 54, 79, 86-88]
IRAK4	miR-146a, miR-132, miR-212	[51]
TRAF4	miR-29	[89]
FADD	miR-155	[38, 40]
IKK β	miR-155, miR-199a	[38, 40, 54, 88]
IKK ϵ	miR-155	[38, 40]
TAB2	miR-155	[38, 40]
RIPK1	miR-155	[38, 40]
TIRAP	miR-145	[31]
BTK	miR-348	[69, 90]
IKK α	miR-223	[91]
MKK4	miR-92a	[92]

Tabla 7. Blancos de los miRNAs identificados en la vía de la señalización de los TLRs (tomado de He et al., 2014).

JUSTIFICACIÓN.

En el año 2005 la Organización Mundial de Salud informó que 1600 millones de adultos padecen sobrepeso y 400 millones padecen obesidad. En el año 2006 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) mostró que el 70% de la población mexicana padece sobrepeso y obesidad. Esto representa en el 71.9% de las mujeres y el 66.7% de los hombres de entre los 30 y 60 años de edad, es decir, más de la mitad de la población mexicana está en riesgo de padecer una enfermedad asociada a la obesidad. Desde el año 2000 México ocupa el primer lugar mundial de bebedores de refrescos de cola. En el día mundial de la alimentación del año 2007 se informó que este país ha entrado a una transición nutricional, ya que los mexicanos comemos 29% menos de fruta, el 27% menos de leche, 18% menos de carne y 37% más de refresco. El informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) del 2013 titulado “El Estado de la Alimentación y la Agricultura 2013”; señaló que México tenía el mayor

índice de obesidad en el mundo con un 32.8% desplazando del primer sitio a EE.UU que cuenta con un 31.8% [World Health Organization Technical report series 894; Hernández, 2016 (ENSANUT MC 2016)]. Si bien existen tratamientos para combatir la obesidad es necesario desarrollar estrategias preventivas más eficientes. La determinación de los factores genéticos que predisponen a un individuo a desarrollar obesidad debe permitir tener estrategias preventivas para identificar de manera temprana a aquellos individuos que tienen un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad. Asimismo, determinar los factores genéticos asociados con un riesgo de enfermedad debe de conducir a la identificación y determinación de biomarcadores de detección temprana de la enfermedad y la identificación de blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos (regiones promotoras de los genes metiladas o la expresión de miRNAs específicos).

HIPÓTESIS.

El estímulo conjunto de ejercicio y dieta provocarán aumento en el grado de metilación en la región promotora de los genes que codifican para los receptores tipo Toll 2, 4 y 9; esto provocará una disminución significativa en la expresión génica de los mismos.

El grado de metilación que se observará en la región promotora de los TLRs correlacionará inversamente con la expresión de estos mismos genes.

OBJETIVO.

Describir el grado de metilación de las regiones promotoras de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 a partir de DNA obtenido de leucocitos provenientes de sangre venosa de pacientes con sobrepeso y obesidad grado I y II, antes y después de un tratamiento de dieta hipocalórica y ejercicio moderado.

- **Objetivos Secundarios**
 - a) Describir la conducta de expresión génica de los miRNAs: 21, 33a, 146a, 155 y 223 obtenidos de suero proveniente de sangre venosa de pacientes con sobrepeso y obesidad grado I y II, antes y después de un tratamiento de dieta hipocalórica y ejercicio moderado.
 - b) Describir la conducta de expresión génica de los miRNAs; 146a, 155 y 223 obtenidos a partir de leucocitos provenientes de sangre venosa de pacientes con sobrepeso y obesidad grado I y II, antes y después de un tratamiento de dieta hipocalórica y ejercicio moderado.

METODOLOGÍA.

- **Tipo de estudio.**

Ensayo clínico autocontrolado, prospectivo, longitudinal.

- **Muestra.**

11 pacientes con diagnóstico de obesidad tipo 1 y 2; se analizaron hombres y mujeres por separado, 3 y 8 respectivamente.

- **Invitación a los pacientes al programa.**

Se realizaron una serie de pláticas informativas a los pacientes candidato dentro de las instalaciones de la escuela Superior de Medicina (ESM) en las cuales se les explicó en qué consistía el programa de dieta y ejercicio, el porqué se estaba realizando el estudio, en qué consistía este, cuáles serían los beneficios de participar en este estudio así como

los beneficios a nivel poblacional de realizar este tipo de estudios; una parte esencial de estas prácticas era el disipar todas las dudas de los pacientes candidatos para mejorar la comunicación entre los especialistas y los pacientes y evitar una alta deserción de estos al protocolo por falta de entendimiento en el mismo.

- Criterios de selección de las pacientes.
 - Criterios de inclusión:
 - Pacientes de 30 a 40 años de edad.
 - IMC de 30 a 39.9.
 - Acepten donar al menos 15 ml de sangre venosa.
 - Disponibilidad de tiempo para asistir a las consultas de seguimiento y a las sesiones de ejercicio.
 - Pacientes que cumplan con valores de normalidad en los parámetros bioquímicos medidos exceptuando los valores de triglicéridos y colesterol, ya que se busca que éstos sean elevados.
 - Criterios de exclusión:
 - Pacientes con diabetes.
 - Hipertensión arterial.
 - Enfermedades cardiovasculares u otras comorbilidades.
 - Pacientes que sigan algún tratamiento para la reducción de peso dentro de los tres meses anteriores al inicio del proyecto.
 - Pacientes que estuvieron o estén tomando algún tratamiento para la reducción de peso dentro de los tres meses anteriores al inicio del proyecto.
 - Pacientes que NO cumplan con los valores de normalidad en los parámetros bioquímicos exceptuando los valores de triglicéridos y colesterol, ya que se busca que estos sean elevados.

- Criterios de eliminación:
 - Pacientes que no se adhieran al tratamiento.
 - Pacientes que no acudan a su consulta nutricional.
 - Pacientes que no acudan a sus sesiones de ejercicio.
 - Pacientes que renuncien voluntariamente al protocolo.

- Firma del consentimiento informado.

Los pacientes antes de iniciar el programa de ejercicio procedieron a firmar el consentimiento informado el cual deslinda a los especialistas, las instituciones y las personas involucradas en el estudio de cualquier acción legal adversa contra el protocolo; además el consentimiento informado otorga el permiso de manipular las muestras a conveniencia del estudio sin rendir ninguna información adicional a los pacientes más que la acordada con antelación y orientarlos en base a los resultados antropométricos y bioquímicos para generar una vida más sana y saludable contemplando evitar lesiones deportivas así como el uso de suplementos y dietas “milagro” sin fundamento científico nutricional real.

- Grupo de estudio.

Para la realización del presente estudio fueron seleccionados 11 pacientes de sexo femenino (3 pacientes conformaban el grupo de sobrepeso; 7 el grupo de obesidad I; finalmente 1 paciente el grupo de obesidad II) de acuerdo a su edad, IMC y parámetros bioquímicos (triglicéridos +150 y colesterol +200). A los pacientes se les prescribió dieta hipocalórica al 20 % [basada en la Guía de Alimentos para la Población Mexicana; el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes; la Norma Oficial Mexicana (NOM) 008-SSA3-2010 para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad; la Norma Oficial Mexicana (NOM) 037-SSA2-2012, para la prevención y control de dislipidemias; finalmente también por los lineamientos dictados por la American Heart Association y

American Diabetes Association] y ejercicio aeróbico con intensidad moderada 3 veces a la semana durante un periodo de 45 minutos en una caminadora. Después de la evaluación antropométrica y bioquímica inicial realizada minutos antes del comenzar el programa de ejercicio se les proporcionó un plan de alimentación. Este procedimiento se repitió cada mes, ajustando el plan de alimentación según los avances observados en cada paciente basándose en los resultados de antropometría y bioquímica.

- Tratamiento nutricional.

El manejo nutricional aplicado en este proyecto de investigación tenía la finalidad de ayudar a los pacientes a mejorar su calidad de vida y disminuir su peso corporal entre un 10 a un 15% para el final de tratamiento. La intervención se llevó a cabo de acuerdo al manejo nutricional dictado en la Norma Oficial Mexicana (NOM) 008-SSA3-2010 para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad; la Norma Oficial Mexicana (NOM) 037-SSA2-2012; para la prevención y control de dislipidemias; los lineamientos de la American Heart Association y American Diabetes Association así como en la Guía de Alimentos para la Población Mexicana y el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes. Las metas de este plan fueron establecer hábitos tanto alimentarios como de actividad física.

- Consultas nutricionales.

Las consultas se llevaron a cabo mensualmente; en éstas se registró el peso corporal, se tomaron los parámetros antropométricos, se evaluó el apego al régimen alimenticio y se calculó el requerimiento calórico; tomando como base los avances observados mensualmente; se fueron corrigiendo los errores que se encontraron en cuanto a hábitos alimenticios de los pacientes.

- Historia clínica.

El historial clínico consiste principalmente en una encuesta en la que se evaluó el estilo de vida de los pacientes; se indagaban las actividades que realizaban éstos y se cuestionaba si consumían algún complemento u suplemento alimenticio, si realizaban alguna actividad física, si tenían algún padecimiento, alergia o intolerancia a algún alimento. Respecto a sus hábitos alimenticios, como son tiempos de comida, gustos y preferencias de los alimentos, cantidades, preparaciones y horarios de comida. Esto fue con la finalidad de conocer más a fondo a cada paciente y poder prescribir un plan personalizado.

El gasto energético total se calculó a partir de las recomendaciones de la NOM 008-SSA3-2010 para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad, la NOM 037-SSA2-2012, para la prevención y control de dislipidemias, y los lineamientos dictados por la American Heart Association y la American Diabetes Association.

- Distribución y composición de la dieta.

La distribución nutrimental de los planes de alimentación se muestra en la tabla 8.

Nutrimento	Porcentaje
Proteínas	15%
Carbohidratos	55%
Lípidos	30%

Tabla 8. Distribución nutrimental de los planes de alimentación.

Con respecto a la distribución de los hidratos de carbono sólo el 10% del total de estos se recomendaron a partir de hidratos de carbono simple; esto se logró a través de fruta. La distribución de la grasa se realizó de la siguiente manera: 20% del total fue de grasa monoinsaturadas mientras que el 10% restante consistió en grasa poliinsaturadas, eliminando de la dieta las grasas saturadas. En cuanto a las proteínas todas fueron de alto valor biológico.

Se obtuvieron planes de alimentación individualizados de acuerdo al peso y talla de cada paciente.

El plan de alimentación que se elaboró para cada paciente contenía 7 ejemplos de menús para cada día de la semana, cabe destacar que este plan fue cíclico con una duración de un mes y que para los dos meses restantes se empleó una nueva estrategia de tratamiento nutricional contenida en la Guía de Alimentos para la Población Mexicana y el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes; en donde se encontraban los grupos y raciones de los mismos; el número total de alimentos fue distribuido en 5 tiempos de comidas (desayuno, comida, cena, colación matutina y colación vespertina).

- Evaluación antropométrica en los pacientes.

Las variables antropométricas que se evaluaron al inicio del programa, a las 4, 8 y 12 semanas fueron las siguientes: estatura, peso corporal, IMC, circunferencia de cintura y cadera, pliegue bicipital, pliegue tricípital, pliegue subescapular, pliegue supraileaco, porcentaje de grasa corporal, porcentaje de masa muscular y porcentaje de agua corporal. Para realizar dichas mediciones se siguieron los lineamientos que establecen el ISAK (sociedad internacional para el avance de la kineantropometría).

- Prueba de esfuerzo

Se realizó para determinar la capacidad funcional de cada individuo con el fin de capturar a los pacientes aptos para la realización del programa de ejercicio, evitando poner en riesgo la integridad física de los participantes. Se realizó en una banda sin fin (caminadora o treadmill) con una duración de 30 min basada en el protocolo de Bruce ajustado según la recomendación y bajo la supervisión de un Maestro en Ciencias de la Salud, un Médico del Deporte, un Licenciado en Alto Rendimiento Deportivo y un Nutriólogo/a. La prueba consistió en un aumento de velocidad e inclinación cada 3 minutos por un periodo total de 30 minutos. Se registró la presión arterial y la frecuencia cardíaca cada 3 minutos con un baumanómetro de mercurio y sensor de frecuencia cardíaca (polar H7):

Periodo/ Estadio	% Inclinación	Inclinación / equipo	Velocidad millas (mph)	Velocidad kilómetros (Km/h)	Tiempo (min)
½	0	0	1.4	2.3	3
1	5	1	1.7	2.7	6
1 ½	10	2	2.1	3.4	9
2	10	2	2.5	4	12
2 ½	12	2	2.9	4.7	15
3	12	2	3.4	5.5	18
3 ½	14	2	3.8	6.1	21
4	14	2	4.2	6.8	24
4 ½	16	2	4.6	7.4	27
5	16	2	5	8	30

- Programa de ejercicio físico aeróbico moderado en pacientes

Posterior a la prueba de esfuerzo los 11 pacientes fueron sometidos al programa de ejercicio (Protocolo de Hashimoto Sayuki) según la recomendación y bajo la supervisión de un Maestro en Ciencias de la Salud, un Médico del Deporte, un Licenciado en Alto Rendimiento Deportivo y un Nutriólogo/a; este programa de ejercicio se realizó en una banda sin fin (caminadora), con una frecuencia de 3 sesiones semanales, de 45 min cada una durante 12 semanas. El ejercicio se llevó a cabo en un rango del 60 al 70% de frecuencia cardíaca máxima, la cual se determinó mediante la fórmula de Karvonen y se monitoreo con un sensor de frecuencia cardíaca (polar H7). También se monitoreo la presión arterial al inicio y al término de cada sesión con un baumanómetro de mercurio.

$$\text{NPM para hombres} = 220 - \text{Edad}$$

$$\text{NPM para mujeres} = 226 - \text{Edad}$$

Etapa	Velocidad (mph)	Tiempo a X velocidad	Tiempo transcurrido
Calentamiento	2.3	3 min	0-3 min
1	2.5	3 min	3-6 min
2	2.7	3 min	6-9 min
3	2.9	3 min	9-12 min
4	3	3 min	12-15 min
5	3.2	3 min	15-18 min
6	3.4	3min	18- 21 min
7	3.6	3 min	21-24 min
8	3.8	3 min	24-27 min
9	4	3 min	27- 30 min
10	4.1	3 min	30-33 min
11	4.2	3 min	33-36 min
12	4.3	3 min	36-39 min
13	4.5	3 min	39-42 min
Enfriamiento	2.3	3 min	42-45 min

- Técnicas y procedimientos.
 - Toma de muestras séricas y sanguíneas

Con ayuda de un especialista, médico del deporte o maestro en ciencias de la salud, todos ellos entrenados en la obtención de sangre venosa; Se extrajeron a todos los pacientes 15 ml de sangre venosa al inicio del protocolo así como al final del mismo, ésta sangre fue extraída en tres tubos Vacutainer de 5 ml c/u (2 con tapa de color morado los cuales tienen añadidos anticoagulante EDTA y 1 con tapa color amarillo con gel).

La sangre se extrajo de la vena radial, de la parte interior del codo. El sitio de punción se limpió con antiséptico. Se colocó una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en el área y hacer que la vena se llenara de sangre, posteriormente se introdujo suavemente una aguja en la vena y se recogió la muestra en

3 tubos (2 morados y 1 amarillo) marca Vacutainer herméticos con EDTA, la banda elástica se retiró del brazo, en seguida se retiró la aguja y se cubrió el sitio de punción para detener cualquier sangrado, la muestra de sangre se conservó en frío, para procesarla en las siguientes 4 horas.

El suero se obtuvo mediante sedimentación por centrifuga de los tubos Vacutainer que contenían la muestra sanguínea a 3200 revoluciones por minuto (RPM) que en gravedades (G) corresponde a 1600 x G en una centrífuga modelo 5207 R de la marca Eppendorf portando un rotor con radio de 122 mm con sus canastillas y adaptadores correspondientes para el tamaño del tubo (5ml). Al separarse el suero de la fase orgánica; mediante una micropipeta se obtuvo 1 ml de suero, éste se colocó en microtubos de 1.5 ml para su posterior utilización almacenándolo a - 80°C en un ultra congelador.

- Determinación del perfil metabólico,

La determinación del perfil metabólico (glucosa, colesterol y triglicéridos) se realizó en las instalaciones del laboratorio clínico de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) a partir de un tubo Vacutainer de 5ml.

- Extracción de RNA y DNA.

Se realizó la extracción del RNA mediante la técnica de trizol; este RNA previamente se extrajo a partir de la lisis de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que fueron separadas de los demás tipos celulares mediante la utilización de una sustancia separadora de gradiente de concentración llamada Ficoll (o bien por su análoga Lymphoprep); el DNA se extrajo mediante el kit “DNA Mammalian blood isolation” de la marca ROCHE. Posteriormente mediante un espectrofotómetro se cuantificó la

concentración del RNA y DNA. Finalmente se determinó la integridad del DNA y del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa.

- Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.

La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando kits comerciales de marca Roche® y Qiagen® de acuerdo con las instrucciones del producto. La cuantificación de la expresión génica relativa de cada uno de los genes blanco: TLR2, TLR4 y TLR9 así como para el gen constitutivo HPRT, se realizó por medio de PCR en tiempo real con sondas Taqman contenidas en una librería de sondas para el transcriptoma humano (Roche Applied Science).

- Estudios de silenciamiento.

El estudio consistió en la caracterización de silenciamiento ya sea por metilación en las islas CpG de los promotores de los genes que codifican para los receptores tipo Toll (TLRs) procedente de muestras de sangre venosa; particularmente para TLR2, TLR4 y TLR9 o bien el silenciamiento mediado por micro RNAs (miRNAs) asociados al silenciamiento de estos TLRs tanto en muestras de suero como en muestras procedentes de sangre venosa, éste se midió caracterizando la expresión de miRNAs por la técnica de PCR tiempo real (miRNA 21, 33a, 146a, 155 y 223 en muestras de suero; y miRNA 146a, 155 y 223 en muestras procedentes de sangre venosa). Además se complementó este estudio midiendo la expresión génica de las muestras procedentes de sangre venosa por medición de RNAm con la técnica de PCR tiempo real para los genes blanco (TLR2, TLR4 y TLR9); todo esto a partir de las muestras obtenidas de la cohorte de 10 pacientes con obesidad grado 1.

- I. Caracterización de metilación en sitios CpG de regiones promotoras de los genes TLR2, TLR4 y TLR9.

Se realizó la caracterización de la metilación a partir de DNA; primero se extrajo el DNA total con el estuche “DNA Isolation Kit for Mammalian Blood - Roche Life Science” a partir de 5ml de sangre venosa. A partir de ese DNA se realizó la amplificación de la región del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 con ayuda de los siguientes iniciadores específicos:

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR2; este DNA no ha sido tratado por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor nativa.

Forward: 5'-gaggtccagagttccctccg -3'
Reverse: 5'-ccgggactaggaagtaagca-3'

Se genera un fragmento de 127 pb.

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR4; este DNA no ha sido tratado por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor nativa.

Forward: 5'-aaaggggaaatggggagtta -3'
Reverse: 5'-tttgcaggacacaatttgg -3'

Se genera un fragmento de 393 pb.

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR9; este DNA no ha sido tratado por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor nativa.

Forward: 5'-ctagtgtaccagcaggggaataagacgat -3'
Reverse: 5'-caggggactgagagctgttg -3'

Se genera un fragmento de 1500 pb.

Posterior a la comprobación de la existencia de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 en el DNA obtenido (hecha mediante la amplificación de sus respectivas regiones de promotor con los iniciadores para regiones nativas) el DNA fue tratado con bisulfito sódico con el estuche “EZ DNA Methylation-Gold™ kit” para evidenciar el grado de metilación que existía en este.

Ya con el DNA convertido se procedió nuevamente a realizar la amplificación de la región del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 con ayuda de los siguientes iniciadores específicos:

A partir DNA tratado con bisulfito sódico y mediante iniciadores específicos para la región del promotor de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 en muestras tratadas con el mismo estuche:

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR2; este DNA ya fue convertido por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor no nativa.

Forward: 5'-tttttttgatttgaatttcg -3'

Reverse: 5'-ccctaacgtaaactaaactacgac -3'

Se genera un fragmento de 188 pb.

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR4; este DNA ya fue convertido por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor no nativa.

Forward: 5'- gtttagcggtttacatgattgat -3'

Reverse: 5- cccgcccttcttataaaaaaact -3'

Se genera un fragmento de 186 pb.

- ✓ Iniciadores diseñados para amplificar la región del promotor de TLR9; este DNA ya fue convertido por bisulfito sódico de manera que se le denomina región del promotor no nativa.

Forward: 5'- aataaattatgaaagattaatgatt -3'
 Reverse: 5'- aactaaacaacaactacaaaaaaaa -3'

Se genera un fragmento de 1407 pb.

Finalmente los amplicones obtenidos a partir de los iniciadores para las regiones de promotor de TLR2 TLR4 Y TLR9 no nativas usados en las muestras convertidas por bisulfito sódico fueron enviados a secuenciación para su posterior análisis (análisis de metilación).

II. Caracterización de miRNAs asociados al silenciamiento de los genes TLR2, TLR4 y TLR9 (miR-21, miR-146a, miR-33a, miR-155 y miR-223).

Séricos

Para realizar la caracterización de los miRNAs a partir de suero primero se realizó la extracción de miRNAs mediante el estuche “miRNeasy Serum/ plasma kit”, como control positivo de expresión se adicionó el “Spike-in Control” (correspondiente a un control interno aislado de *C. Elegans*, corresponde a miRNA 39). Para realizar la reverso transcripción se empleó el estuche “Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit” en conjunto con los iniciadores correspondientes de los genes específicos para cada miRNA; (miR-21, miR-146a, miR-33a, miR-155 y miR-223). Para realizar la expresión génica se emplea el estuche LightCycler® 480 Probes Master en combinación con los iniciadores correspondientes de los genes específicos para cada miRNA; (miR-21, miR-146a, miR-33a, miR-155 y miR-223).

Celular

Para realizar la caracterización de lo miRNAs a partir de células primero se realizó la extracción de miRNAs totales mediante el estuche “RNeasy Mini Kit”, Para realizar la reverso transcripción se empleó el estuche “Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit” en conjunto con los iniciadores correspondientes de los genes específicos para cada miRNA; (miR-U6; miR-146a, miR-155 y miR-223). Para realizar la expresión génica se emplea el estuche LightCycler® 480 Probes Master en combinación con los iniciadores correspondientes de los genes específicos para cada miRNA; (miR-U6; miR-146a, miR-155 y miR-223).

- Estudios de expresión génica de los genes TLR2, TLR4 y TLR9.

Para realizar la expresión génica se emplea el estuche LightCycler® TaqMan® Master en combinación con los iniciadores correspondientes de los genes específicos para cada TLR (TLR2, TLR4 y TLR9).

✓ Iniciadores TLR2

Forward: 5' - cgttctctcaggtgactgctc - 3'
Reverse: 5' - tctcctttggatcctgctt - 3'

Se genera un fragmento de 63 nt.

✓ Iniciadores TLR4

Forward: 5' - ctctctgcgtcagaccag - 3'
Reverse: 5' - tccagtcattgataagtaata - 3'

Se genera un fragmento de 78 nt.

✓ Iniciadores TLR9

Forward: 5' - tattttagtaggggaataagacga - 3'

Reverse: 5'- acttctccaaaaaatctaacgaa - 3'

Se genera un fragmento de 76 nt.

Además de los elementos anteriores se añadieron las sondas de detección correspondientes a cada TLR (TLR2 = sonda # 14, TLR4 = sonda # 33 y TLR9 = sonda # 56) las cuales se obtuvieron de la “Universal Probe Library” de la marca Roche utilizando la herramienta de localización de sondas en línea “Universal ProbeLibrary Assay Design Center”.

- Procesamiento estadístico.

Los datos se procesaron en una base de datos generada en el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22, tomando en cuenta los datos nutricionales, medidas antropométricas, química sanguínea y expresión de cada uno de los genes.

Se realizó una prueba de rangos por signo de Wilcoxon comparando los datos antes y después del programa de 12 semanas de tratamiento. Asimismo se realizaron correlaciones mediante pruebas de Pearson o Rho de Spearman dependiendo si la distribución de los datos obtenidos se comportaba de manera normal o no normal, es decir según lo que los datos requirieran.

RESULTADOS.

Posterior al reclutamiento, clasificación y caracterización pacientes se concluyó con una “n” total de 14 pacientes; de los cuales tres pacientes mujeres conformaban el grupo de sobrepeso, nueve el grupo de obesidad I (Ob I), el cual contaba con dos hombres y siete mujeres; finalmente dos el grupo de obesidad II (Ob II) un hombre y una mujer. Por recomendación del comité sinodal se excluyó de los análisis a los tres hombres que se encontraban dentro de la cohorte: dos en el grupo Ob I y uno en el grupo Ob II; también se decidió unir el grupo de obesidad I y II por ser una clasificación que se puede considerar arbitraria. Respecto al grupo de pacientes con sobrepeso (tres mujeres) se optó por

analizarlo sin hacer un análisis estadístico por ser éste inviable para tres muestras. Cabe destacar que el comportamiento del grupo de sobrepeso presenta tendencias similares al grupo de obesidad I y II en conjunto, además anteriormente se había hecho el análisis estadístico de los 3 grupos en conjunto y se observaba significancia estadística similar; al igual que tendencia parecida. Finalmente se terminaron por analizar estadísticamente 8 pacientes.

- Descripción inicial de los parámetros antropométricos de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes)].

En la tabla 9 se citan las características antropométricas de las 8 pacientes que presentaban obesidad grado I y Obesidad grado II.

- Descripción inicial de los parámetros bioquímicos de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes)].

En la tabla 10 se citan las lecturas de los parámetros bioquímicos de las 8 pacientes que presentaban obesidad grado I y obesidad grado II.

Descripción de las pacientes (grupo Obesidad I y II)			
ANTROPOMÉTRICOS			
	Valor Máximo	Valor Mínimo	Promedio
Edad (Años)	41	38	40
Estatura (mts)	1,58	1,51	1,54
Peso inicial (Kg)	87,90	70,20	76,71
Peso final (kg)	83,20	66,20	71,79
IMC inicial	38,05	29,99	32,33
IMC final	36,01	27,50	30,69
Cintura inicial (cm)	107,00	87,30	96,33
Cintura final (cm)	104,00	82,00	92,07
Cadera inicial (cm)	117,00	106,50	110,46
Cadera final (cm)	112,00	100,00	105,36
ICC Inicial	0,94	0,81	0,87
ICC Final	0,93	0,81	0,87
% Grasa corporal inicial	43,80	34,40	39,38
% Grasa corporal final	47,60	34,00	38,75
% Masa muscular inicial	47,90	39,20	43,91
% Masa muscular final	49,00	38,60	43,35
Pliegue bicipital inicial (cm)	36,00	19,00	25,38
Pliegue Bicipital final (cm)	30,00	13,00	21,63
Pliegue Tricipital inicial (cm)	37,00	20,00	29,13
Pliegue Tricipital final (cm)	34,00	18,00	24,63
Pliegue Supraileaco inicial (cm)	45,00	28,00	35,63
Pliegue Supraileaco final (cm)	35,00	20,00	28,38
Pliegue Subescapular inicial (cm)	47,00	23,00	34,75
Pliegue Subescapular final (cm)	43,00	20,00	29,38

Tabla 9. Descripción inicial de los parámetros antropométricos de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes mujeres)].

Descripción inicial de las pacientes (grupo Obesidad I y II)			
BIOQUÍMICOS			
	Valor Máximo	Valor Mínimo	Promedio
Glucosa inicial (mg/dL)	100	81	90,75
Glucosa final (mg/dL)	101	75	88,63
Colesterol inicial (mg/dL)	236	131	190,00
Colesterol final (mg/dL)	228	141	188,13
Triglicéridos iniciales (mg/dL)	450	142	246,25
Triglicéridos final (mg/dL)	184	71	151,88
Proteína C reactiva inicial (mg/dL)	5,510	0,589	2,004
Proteína c reactiva final (mg/dL)	4,670	0,612	1,717
Apolipoproteína A inicial (mg/dL)	219	33,8	130,33
Apolipoproteína A final (mg/dL)	158	73,4	122,88
Apolipoproteína B inicial (mg/dL)	131	75,5	109,31
Apolipoproteína B final (mg/dL)	155	83,5	111,46

Tabla 10. Descripción inicial de los parámetros bioquímicos de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes mujeres)].

- Descripción inicial de los parámetros moleculares (expresión génica tanto de los TLRs así como de los miRNAs asociados) de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes mujeres)].

En la siguiente tabla (tabla 11) se citan las lecturas de expresión génica de las 8 pacientes que presentaban obesidad grado I y Obesidad grado II.

Descripción inicial de las pacientes (grupo Obesidad I y II)			
EXPRESIÓN GÉNICA			
	Valor Máximo	Valor Mínimo	Promedio
Expresión génica inicial TLR2	19,7795	5,1914	6,0552
Expresión génica final TLR2	9,3711	1,7166	3,1860
Expresión génica inicial TLR4	3,9443	0,5819	0,4248
Expresión génica final TLR4	1,7806	0,2742	0,2364
Expresión génica inicial TLR9	0,5044	0,1302	0,0203
Expresión génica final TLR9	0,1324	0,0278	0,0228
Expresión génica inicial miRNA 21 (Sérico)	0,1050	0,0223	0,0124
Expresión génica final miRNA 21 (Sérico)	0,1415	0,0322	0,0829
Expresión génica inicial miRNA 33a	0,0009	0,0003	0,0008
Expresión génica final miRNA 33a (Sérico)	0,1390	0,0336	0,0568
Expresión génica inicial miRNA 146a (Sérico)	0,0747	0,0112	0,0032
Expresión génica final miRNA 146a (Sérico)	0,0787	0,0134	0,0076
Expresión génica inicial miRNA 155 (Sérico)	0,0019	0,0008	0,0009
Expresión génica final miRNA 155 (Sérico)	0,0016	0,0007	0,0012
Expresión génica inicial miRNA 223 (Sérico)	0,0305	0,0120	0,0180
Expresión génica final miRNA 223 (Sérico)	0,0581	0,0167	0,0266
Expresión génica inicial miRNA 146a (celular)	3,1492	0,7046	1,1765
Expresión génica final miRNA 146a (celular)	2,2460	0,4256	1,0805
Expresión génica inicial miRNA 155 (celular)	0,0335	0,0078	0,0152
Expresión génica final miRNA 155 (celular)	0,0419	0,0096	0,0202
Expresión génica inicial miRNA 223 (celular)	9,4433	4,3028	5,8246
Expresión génica final miRNA 223 (celular)	10,4143	3,8428	6,4727

Tabla 11. Descripción inicial de la expresión génica de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes mujeres)].

Análisis estadístico.

Análisis estadístico de las 8 pacientes mujeres correspondientes a los grupos de obesidad grado I y II.

En la tabla 12 se citan los resultados de los datos antropométricos; bioquímicos y moleculares correspondientes a las 8 mujeres que conformaban los grupos de obesidad grado I y II mediante la prueba de rangos por signo de Wilcoxon:

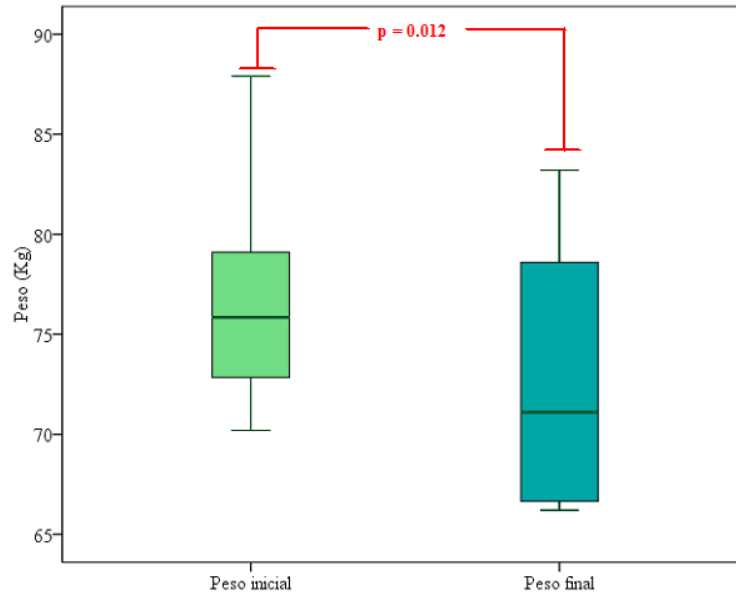
Caracterización total y resultados (valores iniciales VS finales) (grupos Obesidad I y II)				
Parámetro	Prom. Inicial	Prom. Final	Disminución	Prueba de rangos por signo de Wilcoxon [Significancia estadística (p)]
ANTROPOMÉTRICOS				
Peso (kg)	76,71	71,79	4,93	0,012
Circunferencia de cintura (cm)	32,33	30,69	1,65	0,012
Circunferencia de cadera (cm)	96,33	92,07	4,26	0,018
Índice de masa corporal (IMC)	110,46	105,36	5,10	0,011
Índice de cintura - cadera (ICC)	0,87	0,87	0,00	0,751
Porcentaje de masa grasa	39,38	38,75	0,62	0,261
Porcentaje de masa magra	43,91	43,35	0,56	0,262
Longitud pliegue bicipital (cm)	25,38	21,63	3,75	0,027
Longitud pliegue Tricipital (cm)	29,13	24,63	4,50	0,021
Longitud pliegue supraileaco (cm)	35,63	28,38	7,25	0,012
Longitud pliegue subescapular (cm)	34,75	29,38	5,38	0,011
BIOQUÍMICOS				
Glucosa (mg/dL)	90,75	88,625	2,125	0,293
Colesterol (mg/dL)	190,000	188,125	1,875	0,674
Triglicéridos (mg/dL)	246,250	151,875	94,375	0,017
Proteína C reactiva (mg/dL)	2,004	1,717	0,287	0,525
Apo A (mg/dL)	130,325	122,875	7,450	0,484
Apo B (mg/dL)	109,313	111,463	-2,150	0,889
EXPRESIÓN GÉNICA				
TLR2	6,0552	3,1860	2,8692	0,012
TLR4	0,4248	0,2364	0,1884	0,047
TLR9	0,0203	0,0228	-0,0025	0,012
miRNA 21 (sérico)	0,0124	0,0829	-0,0705	0,208
miRNA 33a (sérico)	0,0008	0,0568	-0,0560	0,012
miRNA 146a (sérico)	0,0032	0,0076	-0,0044	0,049
miRNA 155 (sérico)	0,0009	0,0012	-0,0003	0,05
miRNA 223 (sérico)	0,0180	0,0266	-0,0086	0,093
miRNA 146a (celular)	1,1765	1,0805	0,0960	0,161
miRNA 155 (celular)	0,0152	0,0202	-0,0050	0,048
miRNA 223 (celular)	5,8246	6,4727	-0,6481	0,525

Tabla 12. Datos antropométricos; bioquímicos y moleculares de las pacientes [(Ob I y Ob II) (8 pacientes mujeres Se resalta en color rojo los datos que mostraron un comportamiento contrario a lo que se esperaba y en color verde los datos que mostraron un comportamiento esperado)].

Parámetros de normalidad	
Glucosa	de 70 a 100 mg/dL en ayuno
Colesterol	menos de 200 mg/dL
Triglicéridos	menos de 150 mg/dL
Proteína C reactiva	entre 1.0 mg/L y 3.0 mg/L.

I. Resultados de los parámetros antropométricos.

En seguida se muestran las gráficas relevantes de la prueba de rangos por signo de Wilcoxon en relación a los resultados de los parámetros antropométricos. Previos al tratamiento (antes del programa de dieta y ejercicio) VS Posteriores al tratamiento (después del programa de dieta y ejercicio).

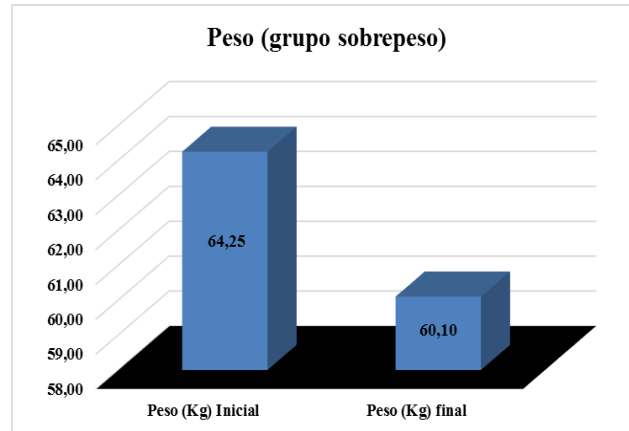


Gráfica 1. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon en relación al peso inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II).

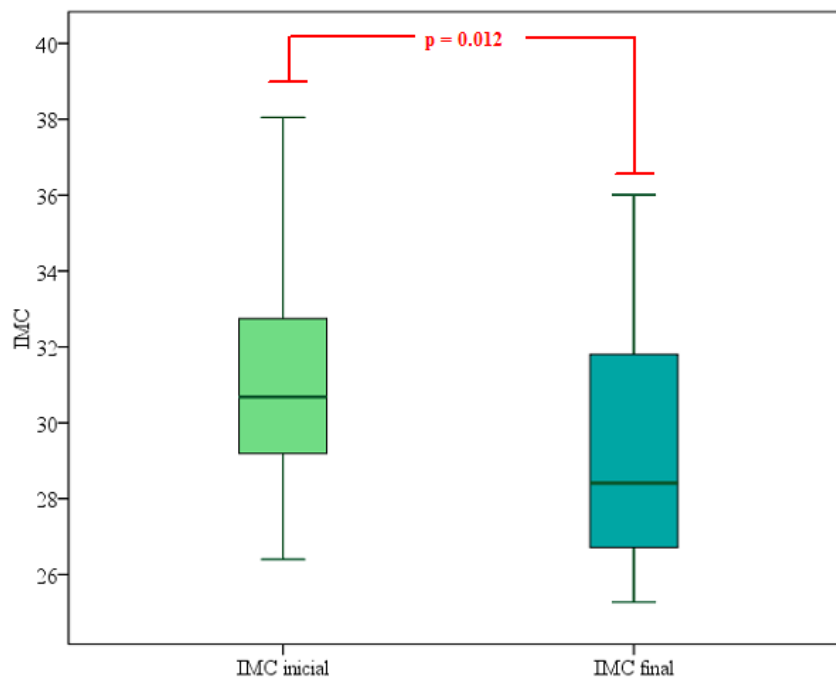
La gráfica 1 muestra las diferencias de peso en kg que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una pérdida de peso de 4.93kg en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.012 ($p=0.012$).

La gráfica 2 muestra las diferencias de peso en kg que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso antes del programa de dieta y ejercicio y, después del

programa de dieta y ejercicio. Se observó una pérdida de peso de 4.15 kg en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.

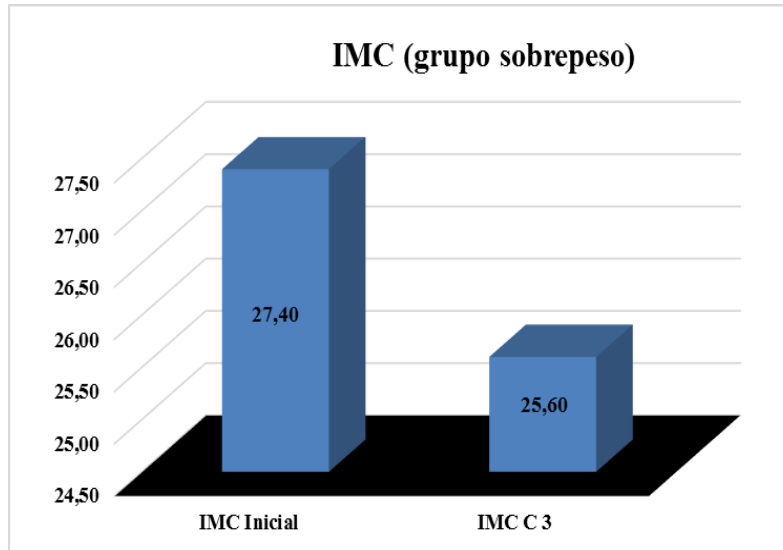


Gráfica 2. Gráfica de peso promedio inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) de las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso



Gráfica 3. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon en relación al IMC inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 3 muestra las diferencias de IMC que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución en el IMC de 5.10 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.011 ($p=0.011$).

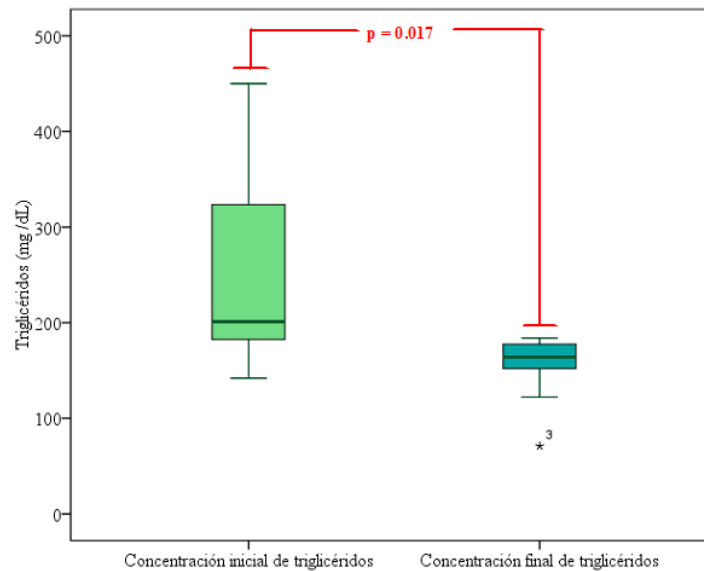


Gráfica 4. IMC promedio inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) de las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso.

La gráfica 4 muestra las diferencias de IMC que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución de 1.8 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.

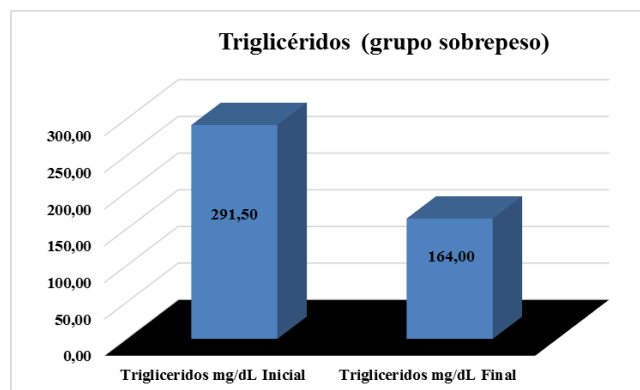
II. Resultados de los parámetros bioquímicos.

En cuanto a los parámetros bioquímicos que se cuantificaron, la concentración de triglicéridos observados pre tratamiento VS post tratamiento disminuyó, lo cual se observa en la gráfica.



Gráfica 5. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon en relación a la concentración de inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 5 muestra las diferencias en los niveles de triglicéridos que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución en la concentración de triglicéridos de 94.375 mg/dL en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.017 ($p=0.017$).

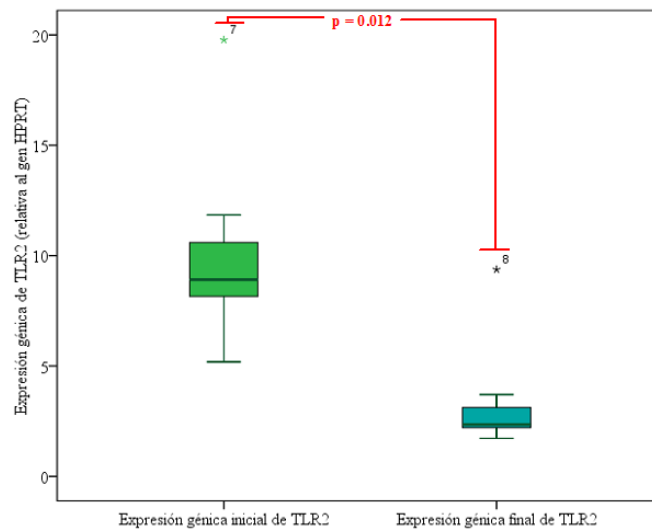


Gráfica 6. Niveles promedio de triglicéridos inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) de las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso.

La gráfica 6 muestra las diferencias en los niveles de triglicéridos que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución de 127.5 mg/dL en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.

III. Resultados de expresión génica.

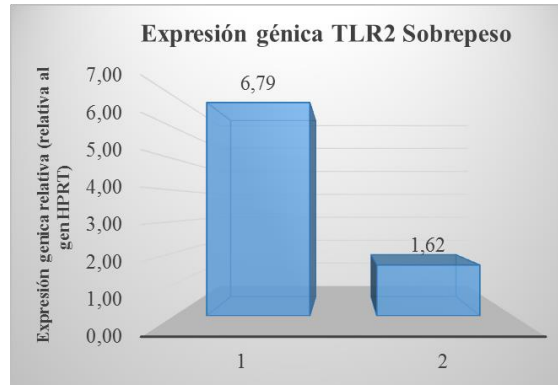
A continuación se observan las gráficas relevantes de la prueba de rangos por signo de Wilcoxon en relación a los resultados pre tratamiento VS los resultados post tratamiento de la expresión génica de TLR2, 4 y 9; así como los miRNAs 21, 33a, 146a, 155 y 223 provenientes de suero y el miRNA 155 expresado intracelularmente.



Gráfica 7. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica de TLR2 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

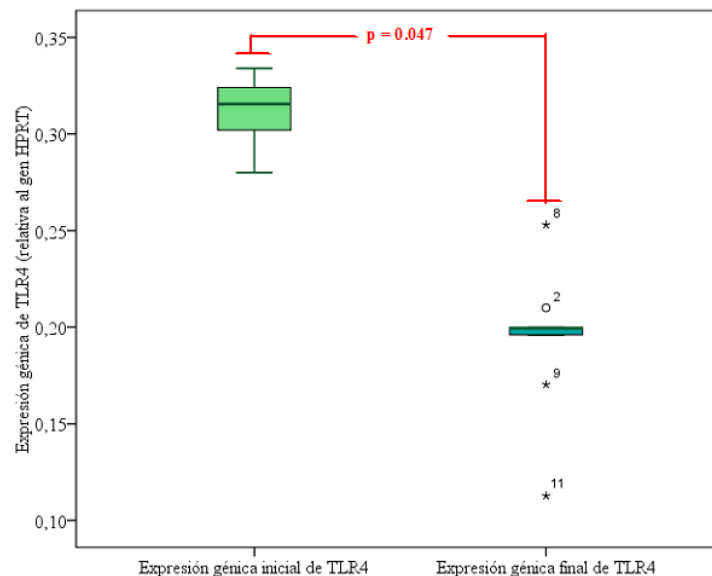
La gráfica 7 muestra las diferencias de expresión génica de TLR2 que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución en la expresión génica de 2.87 en promedio como resultado al

programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.012 ($p=0.012$).



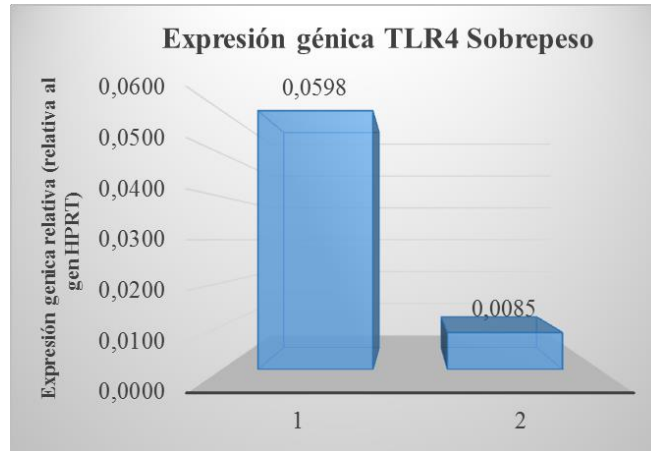
Gráfica 8. Expresión génica de TLR2 observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso).

La gráfica 8 muestra las diferencias de expresión génica de TLR2 que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución de expresión génica de 5.17 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.



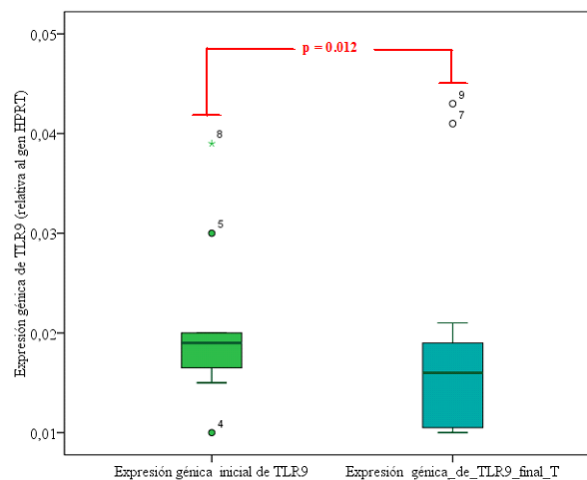
Gráfica 9. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica de TLR4 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 9 muestra las diferencias de expresión génica de TLR4 que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución en la expresión génica de 0.188 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.047 ($p=0.047$).



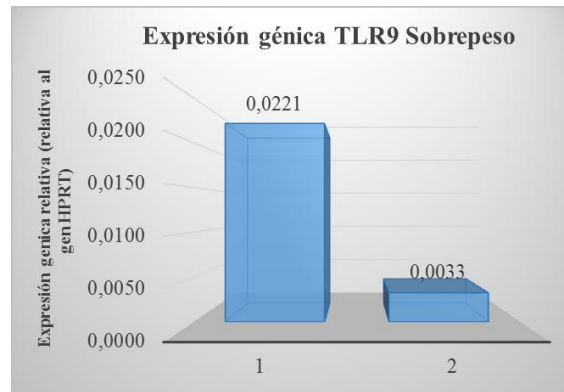
Gráfica 10. Expresión génica de TLR4 observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso)

La gráfica 10 muestra las diferencias de expresión génica de TLR4 que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución de expresión génica de 0.0513 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.



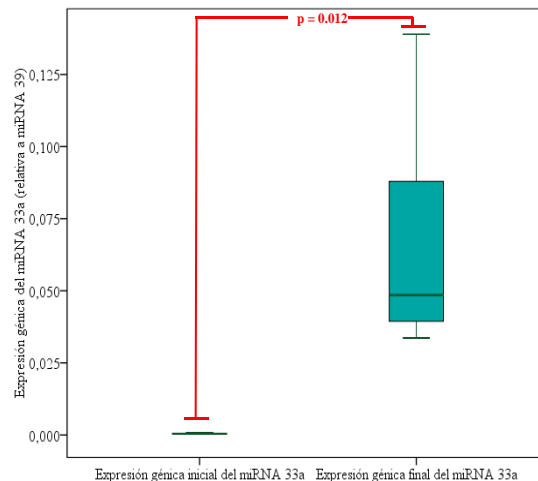
Gráfica 11. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica de TLR9 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 11 muestra las diferencias de expresión génica de TLR9 que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento en la expresión génica de 0.0025 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que el incremento tenía una significancia estadística de 0.012 ($p=0.012$). Los resultados de expresión de este gen no son lo esperado pero ya se hablará del porqué del aumento de la expresión de TLR9 en la discusión.



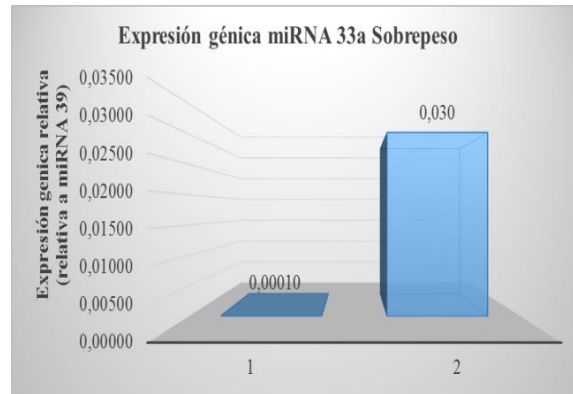
Gráfica 12. Expresión génica de TLR9 observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso).

La gráfica 12 muestra las diferencias de expresión génica de TLR9 que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó una disminución de expresión génica de 0.0188 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio. Esta conducta si concuerda con lo esperado; ya se comentará acerca de eso en la discusión.



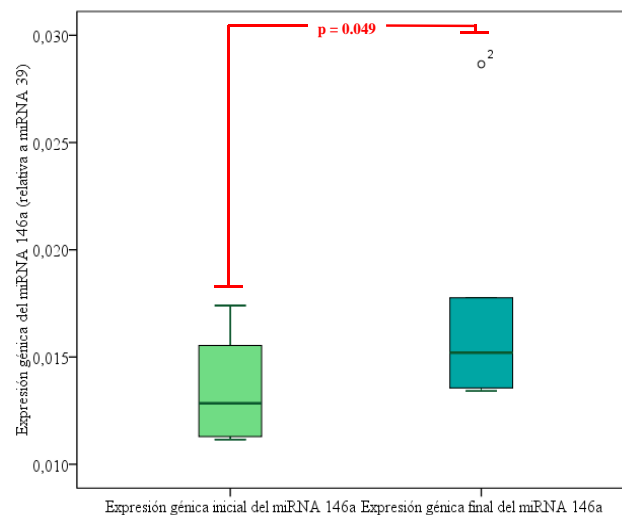
Gráfica 13. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica en suero de miRNA 33a inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 13 muestra las diferencias de expresión génica del miRNA 33a a partir de suero que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento en la expresión génica de 0.0560 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.012 ($p=0.012$).



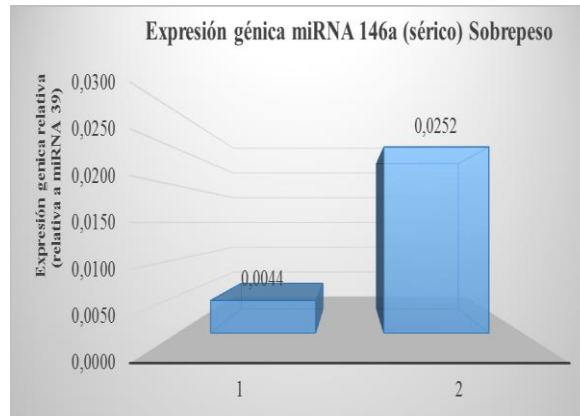
Gráfica 14. Expresión génica en suero de miRNA 33a observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso).

La gráfica 14 muestra las diferencias de expresión génica de miRNA 33a a partir de suero que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y grupo de sobrepeso post tratamiento. Se observó un incremento de expresión génica de 0.0299 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio. Esta conducta si concuerda con lo esperado; ya se comentará acerca de eso en la discusión.



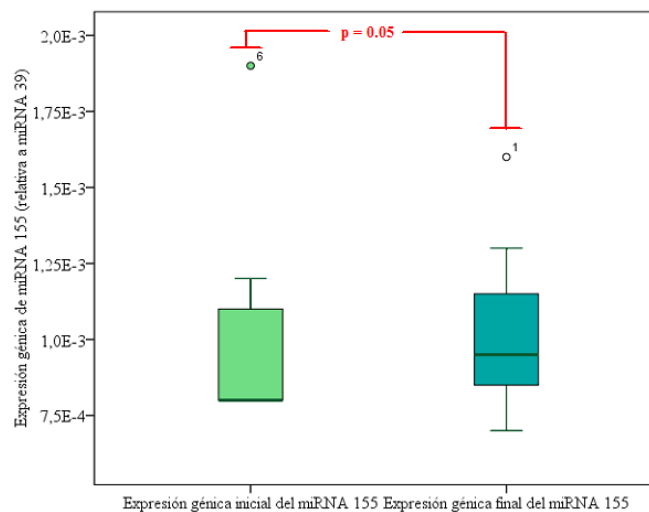
Gráfica 15. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica en suero de miRNA 146a inicial (pre tratamiento) VS final pPost tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 15 muestra las diferencias de expresión génica del miRNA 146a a partir de suero que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento en la expresión génica de 0.0044 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.049 ($p=0.049$).



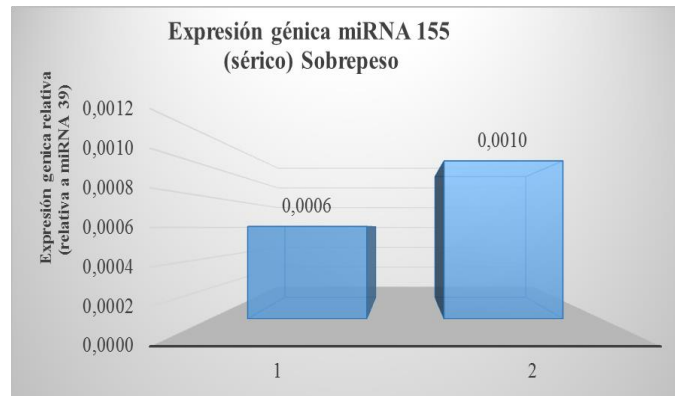
Gráfica 16. Expresión génica en suero de miRNA 146a observada Pre tratamiento VS Post tratamiento [(3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso (se citan los promedios de la conducta Pre tratamiento (1) y Post tratamiento (2))].

La gráfica 16 muestra las diferencias de expresión génica de miRNA 146a a partir de suero que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento de expresión génica de 0.0208 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.



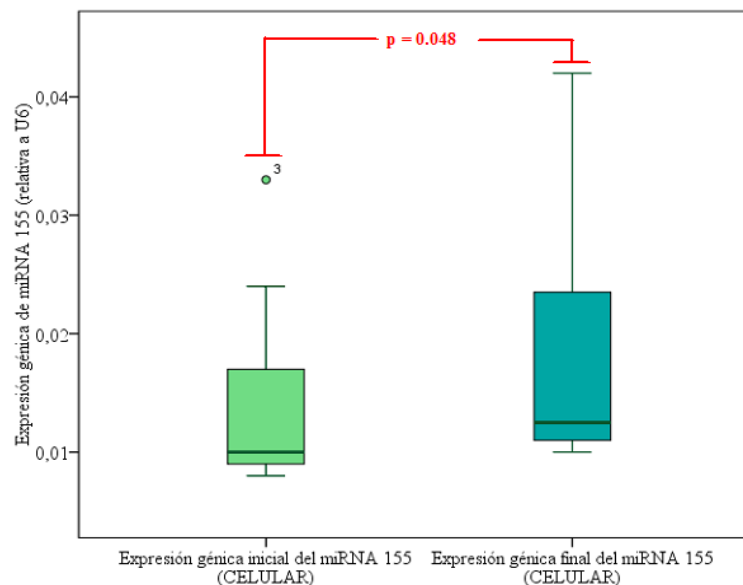
Gráfica 17. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica en suero de miRNA 155 inicial (Pre tratamiento) VS final (Post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 17 muestra las diferencias de expresión génica del miRNA 155 a partir de suero que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento en la expresión génica de 0.0003 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.05 ($p=0.05$).



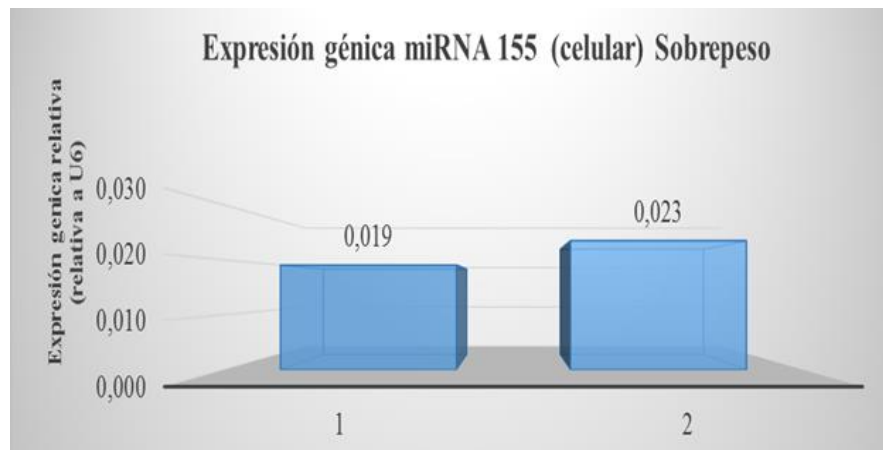
Gráfica 18. Expresión génica en suero de miRNA 155 observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso).

La gráfica 18 muestra las diferencias de expresión génica de miRNA 155 a partir de suero que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento de expresión génica de 0.0004 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.



Gráfica 19. Prueba de rangos por signo de Wilcoxon de la expresión génica en monocitos de miRNA 155 inicial (Pre tratamiento) VS final (Post tratamiento) (8 mujeres que conforman los grupos Ob I y Ob II).

La gráfica 19 muestra las diferencias de expresión génica del miRNA 155 a partir de monocitos (celular) que presentaron las 8 mujeres que conformaban los grupos Ob I y Ob II pre tratamiento y post tratamiento. Se observó un incremento en la expresión génica de 0.005 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio; la prueba de rangos por signo de Wilcoxon arrojó que esta disminución tenía una significancia estadística de 0.048 ($p=0.048$).



Gráfica 20. Expresión génica en monocitos de miRNA 155 observada pre tratamiento (1) VS post tratamiento (2) (promedio de 3 pacientes que conforman el grupo de sobrepeso)

La gráfica 20 muestra las diferencias de expresión génica de miRNA a partir de monocitos (celular) que presentaron las 3 pacientes que conformaban el grupo de sobrepeso antes del programa de dieta y ejercicio y, después del programa de dieta y ejercicio. Se observó un incremento de expresión génica de 0.004 en promedio como resultado al programa de dieta y ejercicio.

IV. Resultados de metilación.

A continuación se ilustran los resultados obtenidos de la electroforesis; en la imagen 1 se muestra el gel de agarosa resultante de la amplificación del fragmento de 127pb correspondiente a la región del promotor de TLR2 (secuencia nativa; DNA no tratado con bisulfito sódico).



Imagen 1. Gel de agarosa producto de la electroforesis en el que se observa un fragmento de 127 pb correspondiente a la región del promotor de TLR2; de las muestras de los pacientes 53AV0 (muestra del paciente pre tratamiento, V0) y 50AV1 (Post tratamiento, V1).

En la imagen 2 se muestra el gel de agarosa producto de la amplificación del fragmento de 393pb correspondiente a la región del promotor de TLR4 (secuencia nativa; DNA no tratado con bisulfito sódico).

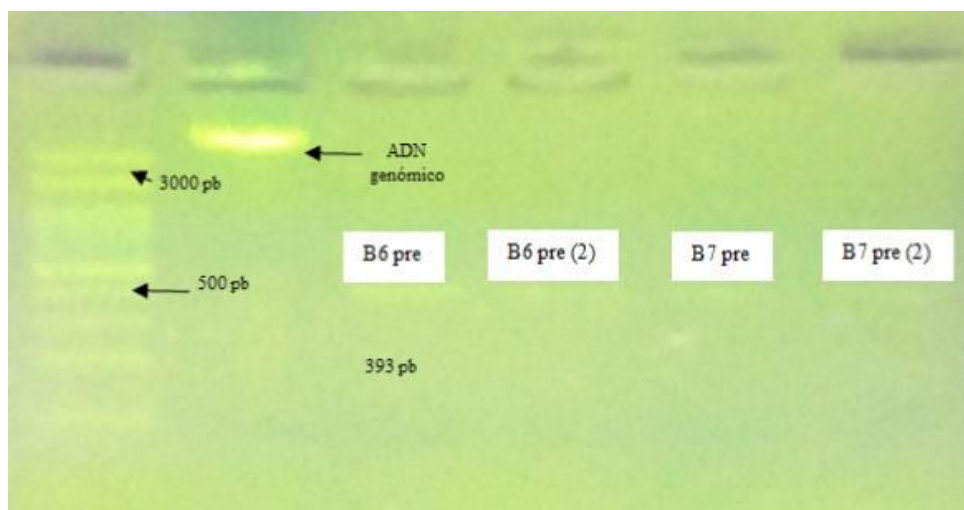


Imagen 2. Gel de agarosa producto de la electroforesis en el que se observa un fragmento de 393 pb correspondiente a la región del promotor de TLR4; de las muestras de los pacientes B6 pre tratamiento y B7 pre tratamiento, las cuales se realizaron por duplicado de allí el 2 entre paréntesis.

En la imagen 3 se muestra el gel de agarosa obtenido de la amplificación del fragmento de 188pb correspondiente a la región del promotor de TLR2 (secuencia no nativa, DNA transformado por bisulfito sódico).

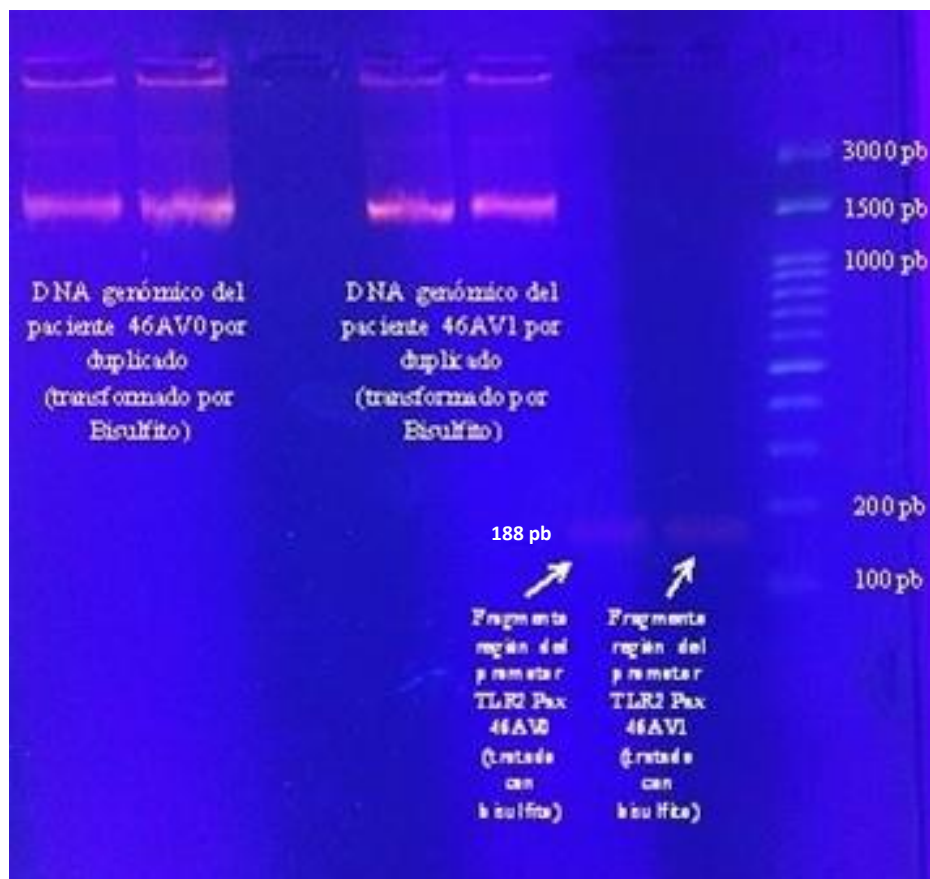


Imagen 3. Gel de agarosa producto de electroforesis; donde se observan dos bandas iniciales en la parte superior a la izquierda de la imagen, las cuales corresponden al DNA genómico convertido por bisulfito sódico del paciente 46AV Pre tratamiento (46AV0, por duplicado); las 2 bandas subsecuentes corresponden a el DNA genómico del mismo paciente convertido por bisulfito sódico Post tratamiento (46 AV1, por duplicado) y al centro del gel las 2 bandas que se observan a la derecha corresponden al amplicón de 188pb de la región del promotor de TLR2 convertido por bisulfito sódico en el paciente 46AV Pre y Post tratamiento respectivamente (46AV0 y 46AV1).

V. Análisis de secuenciación.

- Secuenciación de la región del promotor de TLR2 transformada por bisulfito sódico (no nativa).

Se realizó la conversión por bisulfito sódico de todas las muestras para posteriormente generar un amplicón de la región de promotor del TLR2 (188 pb). Este amplicón se mandó secuenciar; en la imagen 4 se muestra a manera de ejemplo el electroferograma resultante de la secuenciación que se observó en el paciente 46AV.

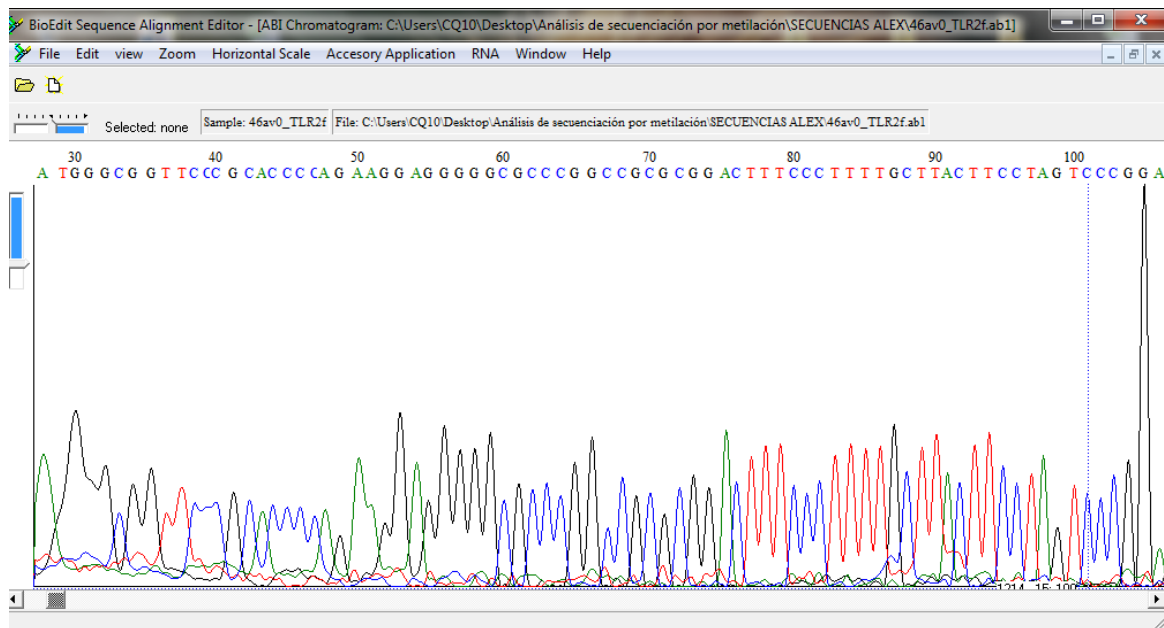


Imagen 4. Electroferograma correspondiente a la lectura de un fragmento de 188 pb correspondiente a la región del promotor de TLR2 de la muestra del paciente 46A-V0 (corresponde específicamente a la lectura del iniciador “forward”).

Con los resultados de la secuenciación se hizo el análisis de metilación de la región del promotor de TLR2, para este análisis se emplearon 13 muestras ya incluyendo a las 3 pacientes de sobrepeso y 10 de las 11 pacientes con obesidad I y obesidad II (se eliminó un paciente hombre con obesidad I del análisis). Seis de estas muestras corresponden a

los 3 pacientes pertenecientes al grupo de sobrepeso (3 muestras pre tratamiento y 3 muestras post tratamiento), y las 20 muestras restantes corresponden a los 10 pacientes pertenecientes al grupo de Obesidad I y Obesidad II (10 muestras pre tratamiento y 10 muestras post tratamiento).

La imagen 5 muestra cómo se realiza el análisis de secuenciación; se compara la secuencia consenso transformada por bisulfito sódico VS la secuencia resultante de la secuenciación de la muestra muestra pre y post tratamiento. Esta contrastación de secuencias se realizó mediante el programa MEGA 6[®]; en este ejemplo se puede observar el caso particular de la comparación entre las muestras provenientes del paciente 48.

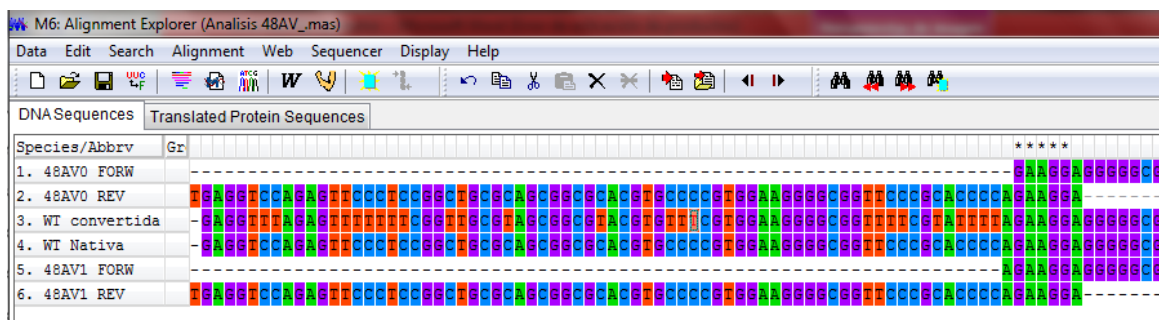
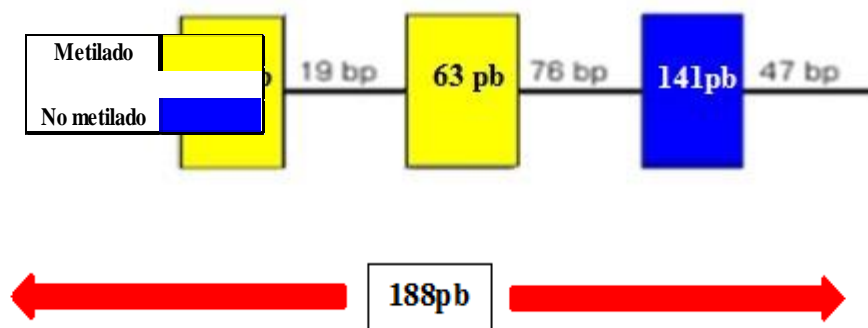


Imagen 5. Emparejamiento que se realizó al hacer el análisis de secuencia mediante el uso del programa informático MEGA 6[®]; se observa el resultado de la lectura de un fragmento de 188 pb correspondiente a la región del promotor de TLR2 de las muestras del provenientes del paciente 48 (Pre y Post tratamiento; 48AV0 y 48AV1 respectivamente).

Adelante se muestra la secuencia del fragmento de la región de promotor de TLR2 188pb; en la secuencia se observan los 3 sitios CpG sensibles a metilación; el primer sitio está ubicado 42pb posteriores al inicio del amplicón, el segundo sitio se encuentra a 63pb posteriores al inicio del amplicón y finalmente el tercer sitio se ubica 141pb posteriores al inicio del amplicón.

3'-ATTGAGAGATTGTCTGGATTATCTTTCTGGAACAATTATACCGAAACAA
 GCTATTTGAGTTTCGACTTGGCAAGGCAAGATATGTCAGTGGATTCTCTTTG
 TGAATGGAAAAAAAAAGCATCCTTATTTTGTATAGAGGCCGCCTCTTTTTGT
 AACTAATTTTTTATTGGTAAAAATTAATTCAAATGT -5'

Esquema resultante del análisis de metilación generado por el programa BiQ analyzer.



Ejemplo de esquemas resultantes del análisis de metilación en el cual se contrasta el antes contra el después del tratamiento de dieta y ejercicio.

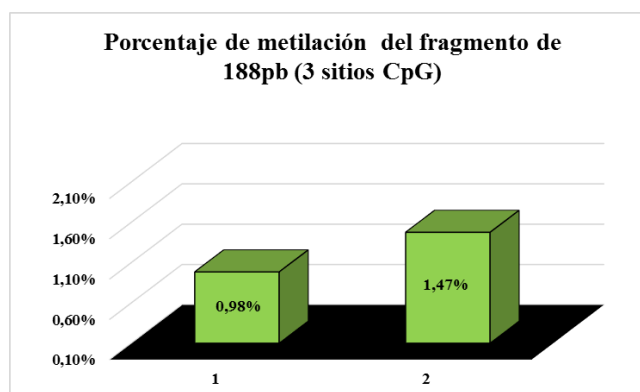
Análisis de metilación en la región del promotor de TLR2 (fragmento de 188 pb)		
Código	Pre tratamiento	Post tratamiento
Grupo obesidad I y II		
06AV	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (No metilado) - 47 bp (No metilado)	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (Metilado) - 47 bp (Metilado)
42AV	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (Metilado) - 47 bp (Metilado)	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (No metilado) - 47 bp (Metilado)
46AV	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (Metilado) - 47 bp (No metilado)	41 bp (No metilado) - 19 bp (Metilado) - 76 bp (Metilado) - 47 bp (No metilado)

En la tabla 13 se observa el resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR2.

Análisis de metilación en la región del promotor de TLR2 (fragmento de 188 pb)				
	# de sitios CpG del promotor de TLR2 metiladas	# de metilaciones en el primer sitio CpG (42 pb)	# de metilaciones en el primer sitio CpG (63 pb)	# de metilaciones en el primer sitio CpG (141 pb)
pre tratamiento	12	6	2	4
post tratamiento	18	4	7	7
% metilación pre tratamiento	30,8	15,4	5,1	10,3
% metilación post tratamiento	46,2	10,3	17,9	17,9

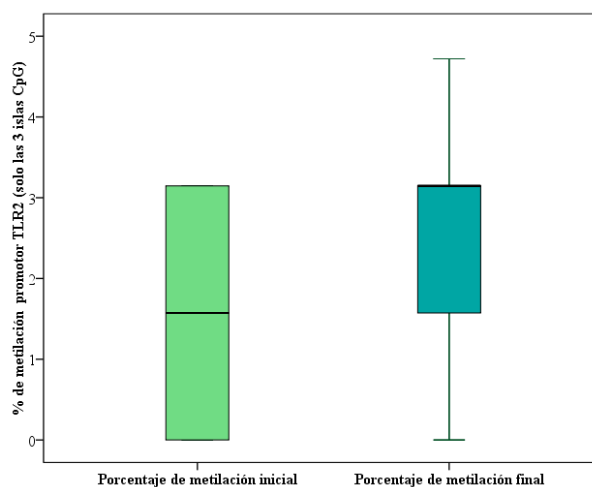
Tabla 13. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR2; el círculo rojo señala puntualmente los cambios en cuanto al porcentaje de metilación antes VS después del programa de dieta y ejercicio; se observa un incremento de metilación del 15.4% como respuesta al programa de dieta y ejercicio.

El fragmento del promotor de TLR2 que se amplificó mide 188 pb; las 6 pb correspondientes a los 3 sitios CpG caracterizados representan tan solo el 3.19% del total del fragmento. La Gráfica 21 muestra los porcentajes de metilación existentes pre tratamiento y post tratamiento, en relación al total del fragmento de 188 pb amplificado donde se observa que la región del promotor de TLR2 se encontraba metilada en un 0.98 % previo y en un 1.47 % posterior al programa de dieta y ejercicio.



Grafica 21. Representación del porcentaje de metilación de TLR2 inicial (1 - pre tratamiento) VS final (2 - post tratamiento).

La Gráfica 22 muestra una representación en esquema de barras y bigotes de los porcentajes de metilación existentes pre tratamiento y post tratamiento en relación al total del fragmento de 188 pb amplificado de TLR2; no se observa ninguna p estadística significativa; este punto se comentará en la discusión.



Grafica 22. Representación en esquema de barras y bigotes del porcentaje de metilación de TLR2 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento).

Un análisis interesante que decidimos añadir a los resultados de nuestro estudio es acerca de cómo se dieron los cambios en metilación a nivel total en nuestro amplicón de 188pb de TLR2. En el siguiente cuadro se cita cuantos sitios CpG perdieron, ganaron o no presentaron cambio de metilación en sus sitios CpG:

Análisis de cambio en metilación en sitios CpG, fragmento (188 pb) del amplicón TLR2 (13 PX, 39 sitios)				
# Islas CpG censadas 39 (13 PX)	Sitios que NO presentaron cambios		Sitios que SI presentaron cambios	
	metilado., s /cambio	desmetilado., s / cambio	metilación de novo	desmetilación
	6	14	13	6
	20		19	
Porcentajes de cambio	15,38%	35,90%	33,33%	15,38%
	51,28%		48,71%	

Se observa que el 48.71 % de los 3 sitios CpG analizados presentaron cambios en cuanto al porcentaje de metilación; dentro de los sitios CpG que si presentaron cambios en el porcentaje de metilación, el 33.33% de los sitios presentaron metilación *de novo* (se puede

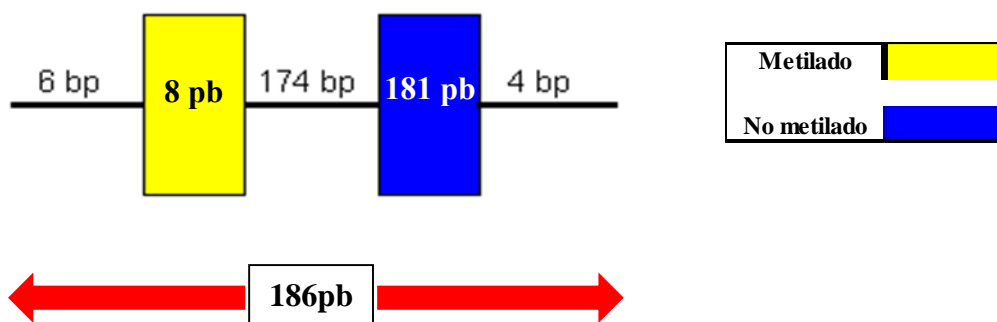
observar en color rojo dentro del cuadro) mientras que el 15,38 % mostraron pérdida de metilación.

- Secuenciación de la región del promotor de TLR4 transformada por bisulfito sódico (no nativa).

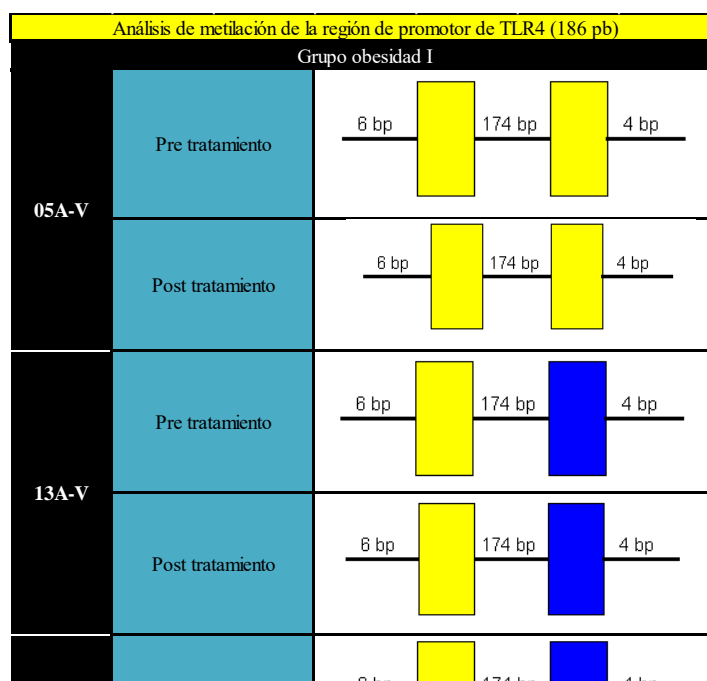
En seguida se observa la secuencia del fragmento de la región de promotor de TLR4 186pb; en la secuencia se observan los 2 sitios CpG sensibles a metilación; los cuales se encuentran ubicados en los sitios: 8pb y 181pb posteriores al inicio del amplicón.

3'- GTTTAG**CG**GTTTATATATTTGATTAATGTTTTAAAGTTATGAGTTATTTA
GTTGAGATTTGAATTTTAGTATATTTTATTTTGAAATTTAGATTTTTTTAAT
TTTTTTGTATTTTTTAAATTGTGTTTTAGTTGAGGTTTATTTTTAGTTTTGTA
TGTGAGTTTTTTTATAAGAAGGGG**CG**GG -5''

Esquema resultante del análisis de metilación generado por el programa BiQ analyzer.



Ejemplo de esquemas resultantes del análisis de metilación en el cual se contrasta el antes contra el después del tratamiento de dieta y ejercicio.



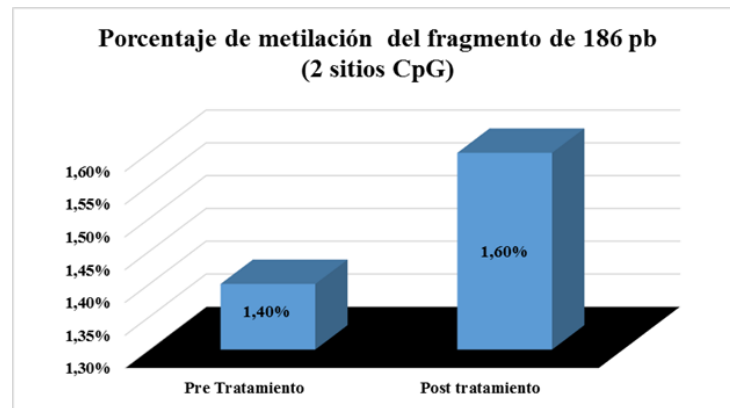
En la tabla 14 se observa el resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR4.

Análisis de metilación en la región del promotor de TLR4 (fragmento de 186 pb)			
	# de sitios CpG del promotor de TLR4 metiladas	# de metilaciones en el primer sitio CpG (8 pb)	# de metilaciones en el segundo sitio CpG (181 pb)
pre tratamiento	13	7	6
post tratamiento	15	8	7
% metilación pre tratamiento	65,0	35,0	30,0
% metilación post tratamiento	75,0	40,0	35,0

Tabla 14. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR4; el círculo rojo señala puntualmente los cambios en cuanto al porcentaje de metilación Pre tratamiento VS post tratamiento; se observa un incremento de metilación del 10% como respuesta al programa de dieta y ejercicio.

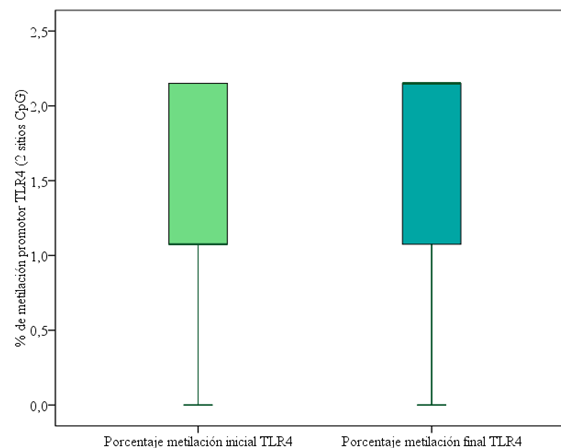
El fragmento del promotor de TLR4 que se amplificó mide 186 pb; las 4 pb correspondientes a los 2 sitios CpG caracterizados representan tan solo el 2.15% del total del fragmento. La Gráfica 23 muestra una representación en gráfica de barras de los porcentajes de metilación existentes pre tratamiento y post tratamiento en relación al total del fragmento de 186 pb amplificado donde se observa que la región del promotor de

TLR4 se encontraba metilada en un 1.4% y en un 1.61% posterior al programa de dieta y ejercicio.



Grafica 23. Representación en gráfica de barras del porcentaje de metilación de TLR4 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento).

La Gráfica 24 muestra una representación en esquema de barras y bigotes de los porcentajes de metilación existentes pre tratamiento y post tratamiento en relación al total del fragmento de 186 pb amplificado de TLR4; no se observa ninguna p estadística significativa; este punto se comentará en la discusión.



Grafica 24. Representación en esquema de barras y bigotes del porcentaje de metilación de TLR4 inicial (pre tratamiento) VS final (post tratamiento).

Finalmente se observa que el 35 % de los 2 sitios CpG presentaron cambios en cuanto al porcentaje de metilación, dentro de los sitios CpG que si presentaron cambios en cuanto al porcentaje de metilación el 25% de los sitios presentaron metilación *de novo* mientras que el 15% mostraron pérdida de metilación.

Respecto al estudio de metilación del fragmento de la región del promotor del gen TLR9 se decidió no analizarlo por encontrar inconsistencias en la expresión de TLR9 contrarias a lo reportado en la literatura.

VI. Factores transcripcionales asociados a TLR2.

Se analizó qué factores de transcripción se unen al fragmento del promotor de TLR2 justo en el sitio CpG o bien a 2 pb alrededor, ya sea a la derecha o a la izquierda (recordemos que los factores de transcripción no se unen solos a las regiones de promotor, siempre se encuentran acompañados por complejos multiprotéicos de anclaje, por esto contemplamos 2 pb al rededor, ya sea a la derecha o a la izquierda) de este. Este análisis se efectuó con ayuda del programa computacional PROMO. En la imagen 6 se muestra el amplicón del fragmento de la región de promotor de TLR2 y se muestran todos los factores de transcripción que se asocian a este fragmento.

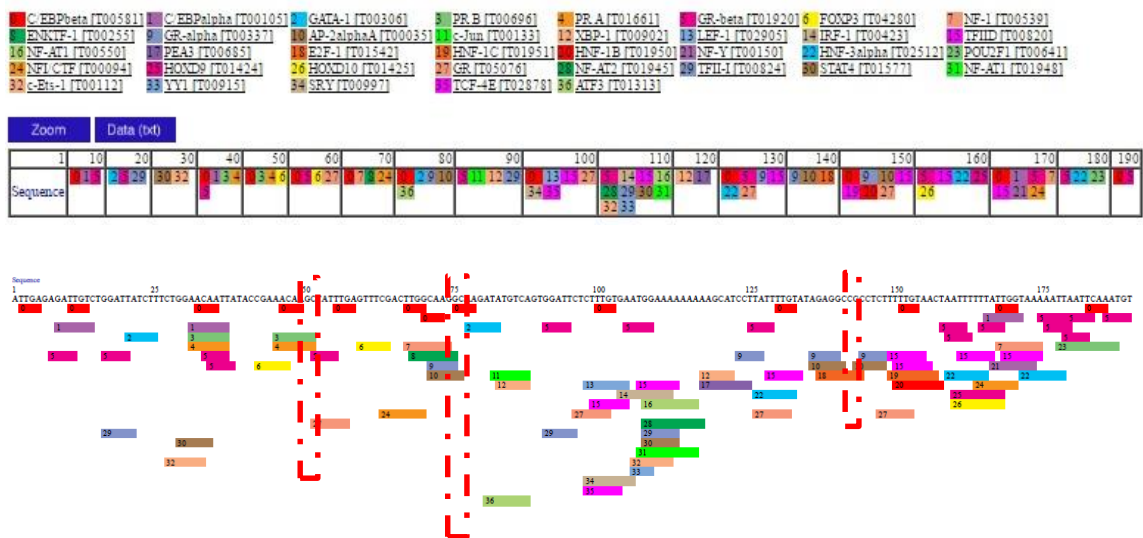


Imagen 6. Fragmento del promotor de TLR2 en donde se muestran todos los factores de transcripción que se anclan al mismo. Los sitios marcados con color rojo señalan los 3 sitios CpG dentro de este fragmento de la región del promotor de TLR2; este análisis se realizó con programa computacional PROMO.

En la imagen 7 se muestran los 3 sitios CpG que se encuentran en el amplicón del fragmento de la región de promotor de TLR2 y se muestran los factores de transcripción que se asocian a estos sitios.

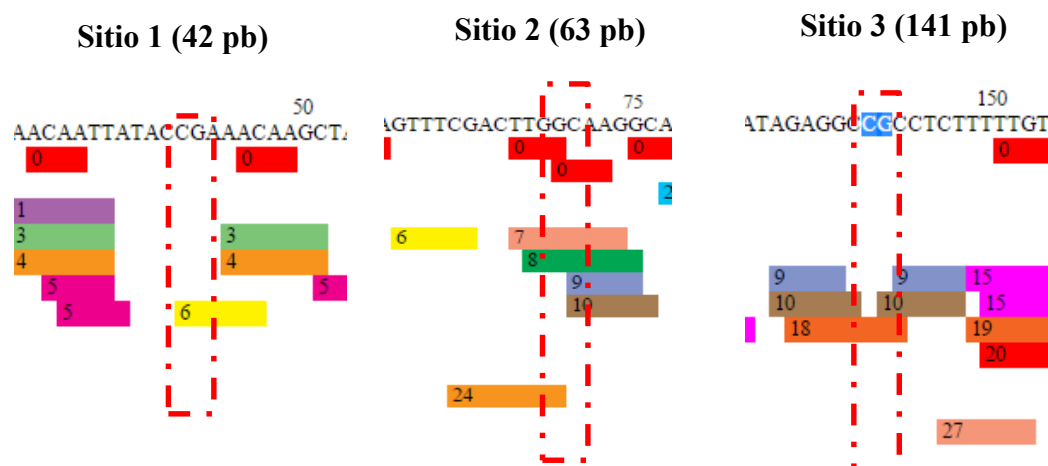


Imagen 7. Fragmento del promotor de TLR2 en donde se muestran los 3 sitios CpG que se encuentran en el amplicón de este gen y se muestran los factores de transcripción que se asocian a estos sitios. Este análisis se realizó con programa computacional PROMO.

Como vimos en la imagen 7 dentro del amplicón correspondiente a la región de promotor de TLR2 que se secuenció se ubican 3 islas CpG; En la tabla 15 se ilustran que factores de transcripción se anclan en estos sitios y que por ende suelen bloquear la expresión de TLR2. Esta tabla también recalca la importancia biológica que tienen estos factores de transcripción.

Posibles factores de transcripción a bloquear en el fragmento de 188pb correspondiente al amplicón del gen TLR2		
Sitio 1 (42 pb)	Sitio 2 (63 pb)	Sitio 3 (141 pb)
PR B (Receptor de progesterona B; metabolismo de lípidos)	ENKTF-1 (factor de transcripción de encefalina)	AP-2 alfaA (represor de RNA polimerasa 2)
PR B (Receptor de progesterona B; metabolismo de lípidos)	NF-1 (Factor nuclear 1; regulador negativo de la transcripción por el promotor de la RNA polimerasa 2)	E2F-1 (Regulación de proliferación celular; metabolismo de p53; estabilizador de mRNA)
C/EBP-beta (Proteína beta potenciadora de unión a CCAAT; respuesta inmune; detección de lipopolisacáridos)	NFI_CTFF (proteína coadyuvante de NF-1)	GR (Receptor de los glucocorticoides; regula metabolismo de lípidos)
FOX P3 (Caja cabeza de tenedor P3; Regulador negativo de inflamación, mediador de respuesta inmune de linfocitos T, interviene en la señalización de NFkB)		GR alfa (Receptor de los glucocorticoides alfa; regula metabolismo de lípidos)

Tabla 15. Factores de transcripción se anclan en el fragmento de la región del promotor de TLR2.

VII. Factores transcripcionales asociados a TLR4.

Se analizó qué factores de transcripción se unen al fragmento del promotor de TLR4 justo en el sitio CpG o bien a 2 pb alrededor, ya sea a la derecha o a la izquierda (recordemos que los factores de transcripción no se unen solos a las regiones de promotor, siempre se encuentran acompañados por complejos multiprotéicos de anclaje, por esto contemplamos 2 pb al rededor, ya sea a la derecha o a la izquierda) de este. Este análisis también se efectuó con ayuda del programa computacional PROMO. En la imagen 8 se muestra el amplicón del fragmento de la región de promotor de TLR4 y se muestran todos los factores de transcripción que se asocian a este fragmento.

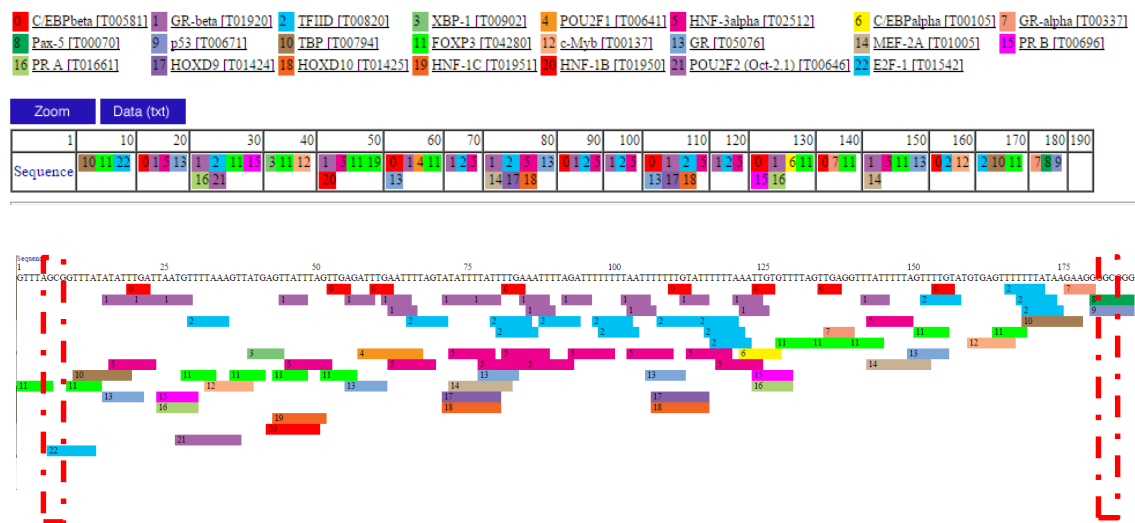
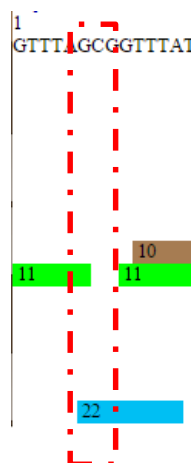


Imagen 8. Fragmento del promotor de TLR en donde se muestran todos los factores de transcripción que se anclan al mismo; los sitios marcados con color rojo señalan los 2 sitios CpG dentro de este fragmento de la región del promotor de TLR4; éste análisis se realizó con programa computacional PROMO.

En la imagen 9 se muestran los 2 sitios CpG que se encuentran en el amplicón del fragmento de la región de promotor de TLR4 y se muestran los factores de transcripción que se asocian a estos sitios.

Sitio 1 (8 pb)



Sitio 2 (181 pb)



Imagen 9. Fragmento del promotor de TLR4 en donde se muestran los 2 sitios CpG que se encuentran en el amplicón de este gen y se muestran los factores de transcripción que se asocian a estos sitios; este análisis también se realizó con programa computacional PROMO.

Como resultado del análisis del amplicón correspondiente a la región de promotor de TLR4 como se menciono previamente se identificarón 2 sitios CpG; ubicados en los sitios: 8pb y 181pb posteriores al inicio del del amplicón. En la tabla 16 se ilustra qué factores de transcripción se anclan en estos sitios silenciado la expresión de TLR4; esta tabla recalca la importancia biológica que tienen estos factores de transcripción.

Posibles factores de transcripción a bloquear en el fragmento de 186pb correspondiente al amplicon del gen TLR4	
Sitio 1 (2pb)	Sitio 2 (181pb)
E2F-1 (regulación de la proliferación celular; regula metabolismo de p53; estabilizador de mRNA)	GR alfa (Receptor de los glucocorticoides alfa; regula el metabolismo de lípidos)
TBP (unión específica de caja TATA; constituye el complejo TF2D; parte del complejo de pre-iniciación de la ARN polimerasa II; implicado en la desnaturalización del ADN)	PAX-5 (dominio de unión a DNA altamente conservado; regulador de desarrollo temprano; las alteraciones de este estan asociadas a la transformación neoplásica; codifica la proteína activadora específica del promueve la diferenciación en linaje de células B (BSAP); asociado a espermatogénesis)
FOX P3 (Caja cabeza de tenedor P3; regulador negativo de Inflamación, mediador de respuesta inmune de linfocitos T, interviene en la señalización de NFkB)	p53 (codifica para la proteína supresora de tumores más ampliamente estudiada; esencial en la inducción de la respuesta celular ante el daño del ADN, arresta el ciclo celular en caso de mutación; activa enzimas reparadoras de daño de DNA; activa el proceso apoptótico; interacciona directamente con la endonucleasa AP y la DNA polimerasa)

Tabla 16. Factores de transcripción se anclan en el fragmento de la región del promotor de TLR4.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

i. Análisis de resultados antropométricos, bioquímicos y de expresión génica.

En la página 71; en la tabla 12 se citan los resultados antropométricos, bioquímicos y de expresión génica. Justo como se había comentado a lo largo de este escrito y confirmando lo que se esperaba, el tratamiento de dieta y ejercicio provocó disminución importante en las medidas de los parámetros antropométricos; peso, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, IMC, porcentaje de masa grasa y la longitud de pliegues: bicipital, tricípital, supraileaco y subescapular disminuyeron. Se encontraron disminuciones estadísticamente significativas en peso, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, IMC y longitud de pliegues: bicipital, tricípital, supraileaco y subescapular. En cuanto al porcentaje de masa grasa se produjo una disminución de 0.62% en promedio, sin embargo esta disminución no presentó significancia estadística.

Las concentraciones de los parámetros bioquímicos como respuesta al estímulo de dieta y ejercicio también disminuyeron. Si bien las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, proteína C reactiva, apolipoproteína A (Apo A) y apolipoproteína B (Apo B) disminuyeron; solo la baja de concentración de triglicéridos presentó una disminución con significancia estadística. Es muy importante comentar que numerosos estudios señalan que el ejercicio aeróbico moderado provoca disminución en la concentración de triglicéridos (Carlson et al., 1967; Fröberg and Mossfeldt 1971; Oscai et al., 1972; Hespanho et al., 2015).

En el caso de la proteína C reactiva, por ser un marcador de inflamación se esperaba que la disminución en concentración tuviera una significancia estadísticamente significativa ya que vincula directamente a la metainflamación que provocan los TLRs sin embargo,

solo se observo una tendencia, llegamos a la conclusión de que solo se observó una tendencia debido a que tenemos una población muestral pequeña. A pesar de esto la disminución de concentración en proteína C reactiva demuestra que al bajar la expresión de los TLRs baja la inflamación de manera importante (Bullo et al., 2006; Esposito et al 2003; Toised et al).

Los resultados de expresión génica mostraron que el estímulo de dieta y ejercicio aeróbico moderado provoca una disminución de la expresión génica de TLR2 y TLR4; estudios realizados inicialmente en roedores y posteriormente en ratones ya habían demostrado que entre menor fuera el peso o el IMC la expresión génica también sería menor (Davis et al., 2008; Booth et al., 2010; Flynn et al., 2003; Francaux et al., 2009; Gleeson 2006) en el presente estudio se demostró que los pacientes al disminuir peso bajo nuestro programa presentaban como respuesta una menor expresión génica; digamos que aunque al inicio tenían una expresión génica alta “característica de ese peso” al bajar el peso también presentan una expresión génica “característica de ese peso”. Esto es muy interesante ya que nos dá una clara relación peso - expresión génica; a esta relación algunos especialistas le denominan “firma de expresión génica”. El presente estudio confirma y refuerza que genes como TLR2 y TLR4 pueden en el futuro formar parte de un panel de biomarcadores sucedáneos a enfermedades como la obesidad.

Contra lo citado en la literatura nosotros observamos un aumento de expresión con significancia estadística de TLR9 previo al programa de dieta y ejercicio y una disminución de expresión con significancia estadística de TLR9 posterior al programa de dieta y ejercicio en las pacientes pertenecientes a los grupo de obesidad I y Obesidad II (ver gráfica 11 en la página 78); esto indica que las personas con obesidad suelen ser normalmente sedentarias y que el estímulo de ejercicio aún siendo aeróbico moderado provoca una alta activación de este gen como respuesta al desgaste metabólico y celular; es decir, los pacientes obesos presentan una respuesta al estímulo de ejercicio aeróbico moderado como si éste fuera aeróbico intenso y no moderado. Esto no sucede en personas con normo peso ya que estas suelen ser de alguna manera más activas (menos sedentarias).

Proponemos observar la conducta de expresión génica que presentan estos mismos pacientes (integrantes del grupo de obesidad I y 2 que no lograron llegar a normopeso) por un periodo más amplio con la hipótesis de que al volverse normopeso presentarían una drástica disminución de la activación de TLR9; justo como se observa en los pacientes con normopeso que han sido descritos en varios estudios previos a este (Mridha et al., 2017; Nishimoto et al., 2016; Hong et al 2015). Una prueba de que esta hipótesis es cierta es lo que se observó en las tres pacientes con sobrepeso (ver gráfica 12 en la página 79) las cuales, efectivamente después del estímulo de dieta y ejercicio respondieron con una disminución de expresión génica de TLR9 como en otros estudios que han analizado al expresión de este gen en personas con normopeso.

ii. Análisis de miRNAs asociados a TLR2, TLR4 y TLR9.

Como ya se comentó reiteradamente en la introducción; los miRNAs inhiben la expresión de los receptores TLRs ya sea por interacción directa con los mRNA's que codifican para estos ó, con la proteína funcional; también ya se mencionó que la misma mecánica de interacción que se da con los TLRs también se opera con varias de las moléculas de señalización que se encuentran río abajo en la cadena de señalización de las vías de TLRs, ya sea por la vía MyD dependiente o la vía MyD independiente.

Para poder entender los resultados; se debe de recordar la relación que existe entre la expresión de los TLRs y los miRNAs que se encuentran inhibiéndolos; por esto en la figura 14 (página 101) se ilustra un ejemplo de cómo miRNA 223 interactúa con TLR2 y con algunas moléculas intermedias que se encuentran en la vía de señalización del mismo.

Al verificar la expresión de los miRNAs asociados con el silenciamiento de TLR2, TLR4 y TLR9 así como los dos miRNAs que se usan como marcador en respuesta al ejercicio [(Baggish et al., 2011; Urbich et al., 2008; Thum et al., 2008; Krichevsky et al., 2009;

Chan et al., 2009) (miRNA 33a y miRNA 146a (se ha asociado escasamente al ejercicio))]
 nuestro estudio confirma lo que indica la literatura: Existe una clara regulación de algunos
 miRNAs sobre diversas moléculas implicadas en la vía de señalización de los TLRs
 (véase en la tabla 7 ubicada en la página 51).

Gran parte de los micro RNAs reportados en la literatura han sido aislados y mapeados a
 partir de suero, sin embargo para ser más precisos, en este estudio también se realizó el
 mapeo de miRNAs procedentes de monocitos. La única respuesta similar en la expresión
 génica miRNAs de suero con la expresión génica de los miRNAs de origen celular fue la
 conducta que observo miRNA 155 (ver tabla 11 en la página 70; gráfica 17 en la página
 81 y la gráfica 19 en la página 82).

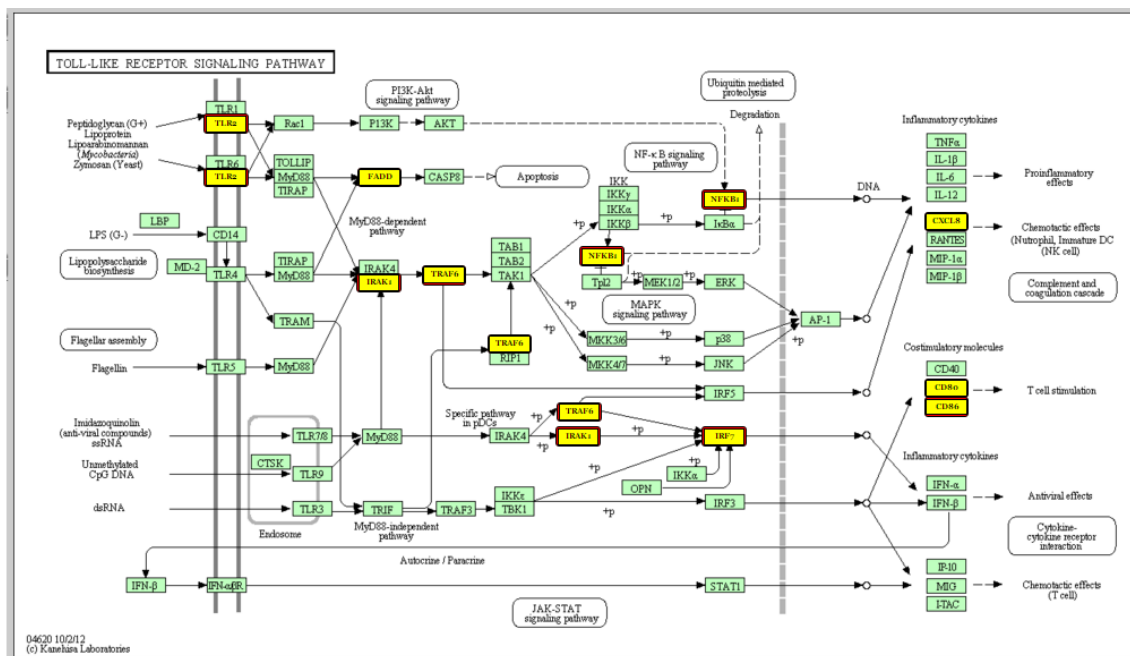


Figura 14. En esta figura se muestra como miRNA 223 interactúa con TLR2 y con las moléculas intermedias que se encuentran en la vía de señalización del mismo. Los cuadros que se ven de color amarillo con borde rojo enmarcan las moléculas que están siendo bloqueadas por este miRNA (miRNA 223) (realizada por simulación “in silico” bajo el programa miRPath v3.0).

iii. Análisis de Metilación del fragmento de la región promotora de TLR2.

Se realizó la determinación de metilación del amplicón correspondiente a un fragmento de la región del promotor de TLR2 de 188 pb en el cual se encuentran 3 islas CpG clave en el anclaje de diversos factores transcripcionales que activan este gen. Se detectó metilación en el primer sitio CpG en las muestras previas al ejercicio y esto era “contrario” a lo que se ha reportado (aumento de metilación con los estímulos de dieta y ejercicio), esto no es del todo cierto; la literatura en general habla de que hay un porcentaje de metilación mayor posterior a los estímulos de dieta y ejercicio, sin embargo lo que reportan los artículos científicos siempre es un balance de metilación global; al leer uno por uno los sitios CpGs mapeadas se observó que el primer sitio CpG (42pb posterior al inicio del amplicón) mapeado, efectivamente se encontraba hipermetilado mayormente en las muestras previas al protocolo de dieta y ejercicio que en las muestras posteriores al programa de dieta y ejercicio (ver tabla 13B, 6 sitios metilados vs 4 sitios metilados respectivamente); sin embargo en los otros 2 sitios CpG mapeados (63 y 141 pb posteriores al inicio del amplicón respectivamente) variaba la metilación inclinándose a que en la mayoría de los sitios se encontraban hipometilados en las muestras previas al programa de dieta y ejercicio (2 sitios metilados vs 7 sitios metilados; 4 sitios metilados VS 7 sitios metilados). Todo esto muestra cómo el patrón de metilación varía según el sitio CpG pero, si se calcula el promedio general de metilación de todos los sitios CpG, entonces el balance se inclina a un porcentaje de metilación total mayor en los sitios CpG pertenecientes a las muestras post dieta y ejercicio.

Análisis de metilación en la región del promotor de TLR2 (fragmento de 188 pb)				
	# de sitios CpG del promotor de TLR2 metiladas	# de metilaciones en el primer sitio CpG (42 pb)	# de metilaciones en el primer sitio CpG (63 pb)	# de metilaciones en el primer sitio CpG (141 pb)
pre tratamiento	12	6	2	4
post tratamiento	18	4	7	7
% metilación pre tratamiento	30,8	15,4	5,1	10,3
% metilación post tratamiento	46,2	10,3	17,9	17,9

Tabla 13B. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR2; el círculo rojo señala puntualmente los cambios en cuanto al número de sitios CpG metilados antes VS después del programa de dieta y ejercicio; se observa una disminución de metilación en el primer sitio CpG mientras que en el segundo y tercer sitio CpG se observa un incremento de metilación como respuesta al programa de dieta y ejercicio.

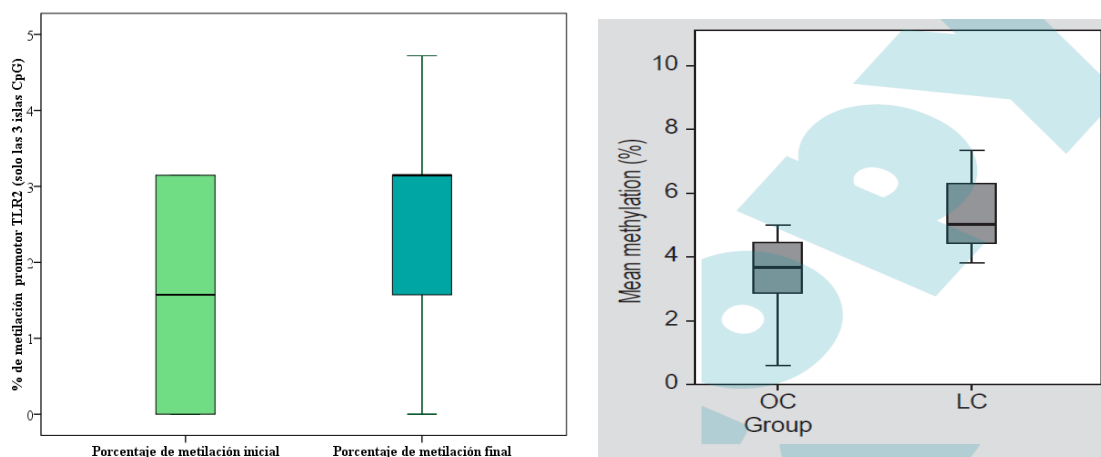
El presente estudio; por ser hecho por la técnica de secuenciación muestra cosas que ningún estudio previo de metilación había descrito; se observa que no todos los sitios susceptibles a metilación “metilan como resultado a estímulos de dieta y ejercicio”, de hecho; se observa claramente que el primer sitio CpG de nuestro fragmento susceptible a metilación pierde metilación; esto da pie a hacer análisis más minuciosos en cuanto a que factores de transcripción se anclan en cada sitio CpG susceptible a metilación *de novo* de manera particular. Si bien al sumar el porcentaje de metilación de todos los sitios CpG nuestro estudio concuerda con todos los estudios ya reportados en cuanto a que estímulos de dieta y ejercicio promueven metilación, es decir incrementan el porcentaje de metilación; es clave asociar cada sitio CpG susceptible a metilación *de novo* con el anclaje de factores transcripcionales clave ya que nosotros observamos que el porcentaje de metilación no aumenta en todos los sitios, solo en el conjunto de estos.

Posterior al inicio del presente estudio surgió un artículo de Remely en el cual medía el porcentaje de metilación de TLR2 y TLR4 en personas con diferentes IMC; nuestros resultados son similares a pesar de que ellos no tenían estímulos de dieta y ejercicio. Son similares en cuanto a que un IMC bajo representa mayor metilación y un IMC alto presenta menor metilación. El estudio de Remely y colaboradores se llama: Beneficial Microbes, “Microbiota and epigenetic regulation of inflammatory mediators in type 2 diabetes and obesity”. Este estudio se publicó en el 2014; mientras que nuestro estudio se comenzó en el 2013. En las gráficas 25, 26 y 27, 28 se muestran las similitudes de resultados; estas similitudes no hacen más que reafirmar que nuestro trabajo proponía una idea de avanzada y que además nuestros resultados son corroborables.

iv. Análisis de Metilación del fragmento de la region promotora de TLR4.

En el caso del fragmento de la región del promotor de TLR4 (186pb) en el cual se encuentran 2 islas CpG clave en el anclaje de diversos factores transcripcionales que activan este gen. Se detectó metilación en el primer sitio CpG (8pb posterior al inicio del amplicón) se encontraba hipometilado mayormente en las muestras previas al protocolo de dieta y ejercicio que en las muestras posteriores al programa de dieta y ejercicio (ver tabla 14B, 7 sitios metilados vs 8 sitios metilados respectivamente); en el segundo sitio CpG (181 pb posterior al inicio del amplicón) también se encontraba hipometilado mayormente en las muestras previas al protocolo de dieta y ejercicio que en las muestras

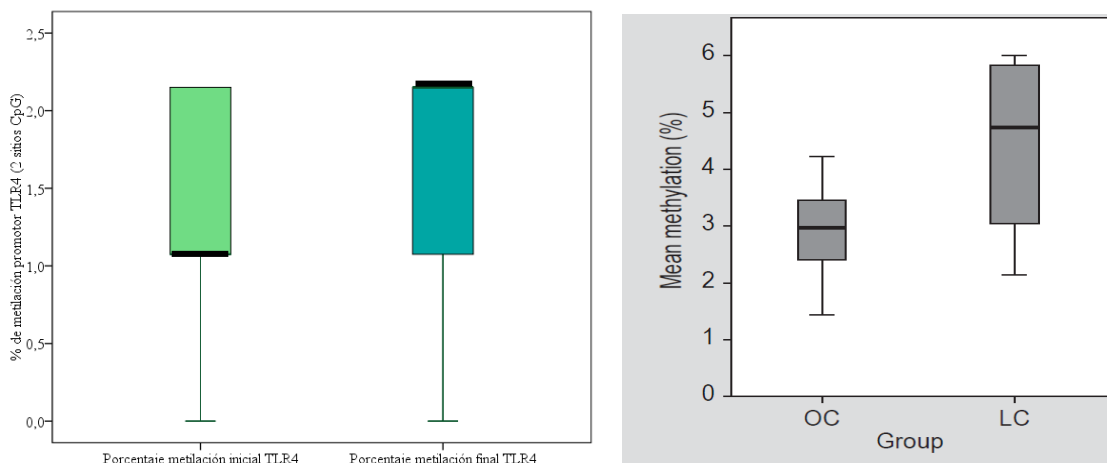
posteriores al programa de dieta y ejercicio (6 sitios metilados vs 7 sitios metilados respectivamente). De manera que, en el caso del fragmento del promotor de TLR4 se observó lo descrito en la literatura, es decir que estímulos de dieta y ejercicio provocan metilación en el gen TLR4.



Gráficas 25 y 26. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR2. La gráfica 25 (lado izquierdo) pertenece a nuestro trabajo, se observa claramente como la metilación aumentó posteriormente al estímulo de dieta y ejercicio (metilación final) comparada contra la observada en el mismo grupo antes del estímulo (metilación inicial). La gráfica 26 (lado derecho) pertenece al trabajo de Remely, y col., se constata cómo los pacientes obesos (OC) presentan menor porcentaje de metilación que los pacientes delgados (LC).

Análisis de metilación en la región del promotor de TLR4 (fragmento de 186 pb)			
	# de sitios CpG del promotor de TLR4 metiladas	# de metilaciones en el primer sitio CpG (8 pb)	# de metilaciones en el segundo sitio CpG (181 pb)
pre tratamiento	13	7	6
post tratamiento	15	8	7
% metilación pre tratamiento	65,0	35,0	30,0
% metilación post tratamiento	75,0	40,0	35,0

Tabla 14B. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR4; el círculo rojo señala puntualmente los cambios en cuanto al número de sitios CpG metilados antes VS después del programa de dieta y ejercicio; se observa un aumento de metilación en el primer y segundo sitio CpG como respuesta al programa de dieta y ejercicio.



Gráficas 27 y 28. Resultado del análisis de metilación del fragmento amplificado de la región del promotor de TLR4. La gráfica 27 (lado izquierdo) pertenece a nuestro trabajo y se observa como la metilación aumentó posteriormente al estímulo de dieta y ejercicio (metilación final) comparado contra el mismo grupo antes del estímulo (metilación inicial); La gráfica 28 (lado derecho) pertenece al trabajo de Remely, y col., se constata cómo los pacientes obesos (OC) presentan menor porcentaje de metilación que los pacientes delgados (LC).

Los resultados muestran que estímulos medioambientales como dieta y ejercicio promueven una baja de expresión en los TLRs; podríamos argumentar que esta subexpresión se debe al silenciamiento por metilación; sin embargo eso no es del todo cierto. Gracias al mapeo de miRNAs asociados al silenciamiento de estos TLRs o bien al silenciamiento de moléculas río abajo dentro de la cadena de señalización nos damos cuenta que el silenciamiento es un sistema absolutamente dinámico y, no hay un solo mecanismo operando para silenciar la expresión de estos genes. En este trabajo se analizó metilación y miRNAs y los resultados demuestran que ambos mecanismos operan para regular la expresión de los TLRs asociados a la metainflamación; siguiendo la misma línea de ideas eso significa que probablemente mecanismos epigenéticos reguladores como lo son la acetilación y/o desacetilación de histonas también pudieran estar operando para regular la expresión de TLR2, TLR4 y TLR9; que en este estudio no se hallan caracterizado no significa que no estén operando en este fenómeno. Hay varios datos reveladores que se desprenden de este estudio:

- ✓ El mecanismo de silenciamiento es dinámico y no se le puede atribuir a un solo mecanismo de regulación epigenético.
- ✓ El análisis de los factores de transcripción que se unen a los sitios CpG es crucial ya que dependiendo que factor de transcripción se este bloqueando es el grado de impacto que puede darse a nivel metabólico.
- ✓ Estímulos medioambientales como dieta y ejercicio establecidos de manera sistematizada son completamente capaces de cambiar e incluso corregir algunas patologías que tradicionalmente son tratadas mediante fármacos,
- ✓ El mapeo de genes clave (en esta caso TLR2 y/o TLR4) en tejido sucedáneo como lo es la sangre periférica puede ser de gran apoyo en el diagnostico, tratamiento y pronostico de disminución de algunas patologías multifactoriales como es el caso de la obesidad.

LITERATURA CONSULTADA.

1. Valadkhan, Gunawardane. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays Biochem.* 2013. 54:79-90.
2. Matera, Terns, Terns. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007 (2014). 8 (3): 209–220.
3. Guo, Zhuojun, Karunatilaka, Krishanthi, Rueda. Single-molecule analysis of protein-free U2–U6 snRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2009 (2014). 16 (11): 1154–1159.
4. Craig, Nancy, L., (2010) *Molecular Biology: Principles of Genome Function.* Oxford: Oxford UP.
5. Ma, Lina, Bajic, Vladimir, Zhang. "On the classification of long non-coding RNAs". *RNA Biology.* 2014. 10 (6): 924–933.
6. Lyon. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961. 190: 372–373.
7. Lee. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. 12: 815–826.
8. Kung, Colognori and Lee. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics.* 2013. 193: 651–669.
9. Kinnaird, Zhao, Wellen and Michelakis. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev. Cancer.* 2016. 16(11): 694-707. **Review.**
10. Rana. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007. 8: 23-3.
11. Bantounas, Phylactou and Uney. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2004. 33: 545–557.
12. Hannon. RNA interference *Nature.* 2002, 418: 244-251.
13. McManus and Sharp. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews.* 2002. 3: 737-747.
14. Vázquez-Ortiz, Piña-Sánchez, Salcedo. Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA. *Revista investigación clínica.* 2006. 58 (4): 335-349.
15. Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004. 116 (2): 281–97.

16. Bernstein, Caudy, Hammond, Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 409 (6818):363-6.
17. Kurihara, Watanabe. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*-. 2004. 101 (34): 12753-8.
18. Gao. Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks. *Trends in Neurosciences*. 2007. 31: 20.
19. Stark, Bushati, Jan, et al. A single Hox locus in *Drosophila* produces functional microRNA from opposite DNA strands. *Genes Dev*. 2008. 22 (1): 8-13.
20. Esquela-Kerscher, Slack. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006. 6 (4): 259-69. **Review.**
21. Berger, Kouzarides, Shiekhattar, Shilatifard. An operational definition of epigenetics. *Genes Development*; 2009. 23: 781-783.
22. Waddington. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *drosophila*. *Protocols of Natural academy of Science*. 1939. 25: 299-307.
23. Kaminker. Epigenetics: the science of heritable biological adaptation. *Arch Argent Pediatr*. 2007. 105 (6): 529-531.
24. Jaenisch, Bird. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. 2003. 33:245-54.
25. Química orgánica. Robert Thornton Morrison, Robert Neilson Boyd. 5ª ed. Pearson Educación, 1998. ISBN: 9684443404 Pág. 65.
26. Luoman (s.f) [Imagen obtenida de “<http://www.istockphoto.com/mx>”]
27. Capuano, Muelleder, Kok, Blom, Ralser. Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and other yeast species. *Analytical Chemistry*. 2014. 86 (8): 23-7
28. Miller, Sweatt. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. 2007. 53 (6): 857-869.
29. Powell, Devin. Memories may be stored on your DNA. *New Scientist*. 2008.

30. García, Ayala, Perdomo. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud.* 2012. 10 (1):59-71.
31. Kim, Samaranyake, Pradhan. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66 (4):596-612.
32. Rakyan, Preis, Morgan, Whitelaw. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J.* 2001. 356 (Pt 1):1-10.
33. Rönn, Volkov, Davegårdh, Dayeh, Hall, Olsson, Nilsson, Tornberg, Dekker, Eriksson, Jones, Groop, Ling. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLOS Genetics.* 2013 9 (6): e1003572.
34. Goll, Bestor. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 481-514.
35. Klose, Bird. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31 (2):89-97.
36. Ling and Rönn. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans. *Discovery Today.* 2014. Vol. 00. (001) 2-4.
37. Barrès, Yan, Egan, Treebak, Rasmussen, Fritz, Caidahl, Krook, O'Gorman, Zierath. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle». *Cell Metabolism.* 2012. 15 (3): 405-411.
38. Alberts, Bruce et al. (1996). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona: Ediciones Omega. ISBN 84-282-1011-X.
39. Wu, Panusz, Hatch and Bonner. Histones and their modifications, *Crit Rev Biochem.* 1986. 20: 201-263.
40. García-Giménez. Epigenética. La gramática del código genético. *Journal of Feelsynapsis.* 2012. ISSN 2254-3651. 4:34-38.
41. Bártoová, Krejčí, Harnicarová, Galiová, Kozubek. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 2008. 56 (8):711-21.
42. Ling and Groop. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2009. 58: 2718–2725.

43. Devaskar and Raychaudhuri. Epigenetics – A Science of Heritable Biological Adaptation. *Pediatric Research*. 2007. Vol. 61. No. 5. pp 2.
44. Sherin, Simi, Shameena, Sudha. Changing trends in oral cancer. *Indian Journal of Cancer*. 2008. 45(3): 93-6.
45. Arteaga. El sobrepeso y la obesidad como un problema de salud. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2012. 23(2): 145-153.
46. Bulló, Casas-Agustench, Amigó-Correig, Aranceta, Salas-Salvadó. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr*. 2007. 10(10A):1164-72. **Review**.
47. Pischon, Nöthlings, Boeing. Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc*. 2008. 67(2):128-45. **Review**.
48. Lementowski, Zelicof. Obesity and osteoarthritis. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2008. 37(3):148-51. **Review**.
49. Jarrett. Atherosclerosis, diabetes and obesity. *Proc Nutr Soc*. 1981 40(2):209-12. **Review**.
50. Barquera, Flores, Olaiz, Rivera, Sepúlveda. Dyslipidemias and obesity in Mexico. *Salud Pública Mex*. 2007. 49 (3): S338-S347.
51. Olaiz-Fernández, Rivera-Dommarco, Rojas, Villalpando-Hernández, Hernández-Ávila, Sepúlveda-Amor. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006). Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
52. Duncan, and Schmidt. Diabesity: an inflammatory metabolic condition. *Clin Chem Lab Med*. 2003. 41(9):1120-30. **Review**.
53. Vgontzas, Bixler, Papanicolaou, Chrousos. Chronic systemic inflammation in overweight and obese adults. *JAMA*. 2000. 283(17):2235
54. Richelsen, Bruun, Pedersen. Fatty tissue as a secretory organ. Significance for obesity-related diseases. *Ugeskr Laeger*. 2001.163(21):2913-7. **Review**.
55. Nishimura, Murayama. Periodontal inflammation and insulin resistance--lessons from obesity. *J. Dent Res*. 2001. 80(8):1690-4.
56. World Health Organization Technical report series 894: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization. 2000. PDF. ISBN 92-4-120894-5.

57. Hernández. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe Final de Resultados. Instituto Nacional de Salud Pública. 14 de diciembre 2016.
58. Gutiérrez, Rivera-Dommarco, Shamah-Levy, Villalpando-Hernández, Franco, Cuevas-Nasu, Romero-Martínez, Hernández-Ávila. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
59. FAO. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe: 2012. Santiago de Chile: FAO. 2012. [citado mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/publicaciones/panorama-2012/>.
60. Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. *Arch. argent. pediatr.* 2005. Vol. 103, No. 3, p. 262.
61. Diez datos sobre la obesidad, clasificación del IMC. Organización Mundial de la Salud Consultado el 6 de junio de 2011.
62. Manson, Willett, Stampfer. Body weight and mortality among women. *N. Engl. J. Med.* 1995. Vol. 333, No 11. p. 677- 685.
63. Norma Oficial Mexicana NOM-0043--SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación [en línea]. Diario Oficial de la Federación. 28 de mayo de 2012. [consulta: 30 Junio 2017].
64. Bray. Medical consequences of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. Vol. 6, No. 89, p. 2583-2589.
65. Bullo, Casas-Agustench, Amigo-Correig, Aranceta and Salas-Salvado. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutrition.* 2006. 10 (10A), 1164–1172.
66. Clotilde Vásquez, Ana I de Cos, Coral Calvo, Consuelo L. Nomdedeu et al., OBESIDAD, Manual teórico-práctico. 2011. Ediciones Díaz de Santos.
67. Bray, Lee, Bray. Weight gain of rats fed medium-chain triglycerides is less than rats fed long-chain triglycerides. *Int. J. Obes.* 1980. Vol. 4, No. 1, p. 27-32.
68. Mingrone G., Castagneto M., Greco A. Reversibility of insulin resistance in obesity through bariatric surgery and nutritional means. Deitel M, Cowan Jr GMS, editors, Toronto. 2000.

69. Alfieri, Pomerleau, Grace. A comparison of fat intake in of normal weight, moderately obese and severely obese subjects. *Obes. Surg.* 1997; Vol. 7, No. 1, p. 9-15.
70. Ravussin, Swinburn, Pathophysiology of obesity. *Lancet.* 1992. No 340, p. 404.
71. Samuel, Petersen, Shulman. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet.* 2010. Vol. 375. No. 26, p. 2267 – 2277.
72. Mootha, Lindgren, Eriksson. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 2003. No. 34, p. 267-273.
73. Patti, Butte, Crunkhorn. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. No. 100, p. 8466–8471.
74. Loftus and Lane. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1997. No 7, p.603-608.
75. Tien-Jyun, Wei-Jei, Hui-Min, Kuan-Ching, Lee-Ming. Expression of subcutaneous adipose tissue phosphoenolpyruvate carboxykinase correlates with body mass index in nondiabetic women. *Metabolism Clinical and Experimental.* 2008. No 57, p. 367–372.
76. Paterno. Factores de riesgo coronario en la adolescencia. Estudio FRICELA. *Rev. Esp. Cardiol.* 2003. 56 (5): 452-458.
77. Bouchard, Malina & Perusse (1997). Genetics of fitness and physical performance. *Human Kinetics.*
78. Roth et al., 2007. Perspective on the future use of genomics in **exercise** prescription. *J Appl Physiol* (1985). 2008. 104(4):1243-5.
79. Acosta-felquer, De la rosa. Fisiología del ejercicio: Cátedra I de Fisiología Humana. Facultad de Medicina – Universidad nacional del Nordeste. 2002. 12-17.
80. Laskowski. The role of exercise in the treatment of obesity. *PM. R.* 2012. 4 (11): 840-4.
81. Moinuddin, Collins, Kramer, Leehey. Exercise in the management of Obesity. *Journal of Obesity & Weight Loss Therapy.* 2012. 2: 117.

82. Haskell, Lee, Pate, Powell, Blair, Franklin, Macera, Heath, Thompson, Bauma. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association *Med Sci Sports Exerc.* 2007.39 (8):1423-34.
83. Shaw, Gennat, O'Rourke, Del Mar. Exercise for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006. (4):CD003817.
84. Gnacińska, Małgorzewicz, Stojek, Łysiak-Szydłowska, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv Med Sci.* 2009. 54 (2):150-7 **Review**.
85. Nounou, Deif, Shalaby. Effect of flaxseed supplementation and exercise training on lipid profile, oxidative stress and inflammation in rats with myocardial ischemia. *Lipids Health Dis.* 2012. 11:129.
86. Leermakers, Dunn, Blair. Exercise management of obesity. *Med Clin North Am.* 2000. 84(2): 419-40. **Review**
87. Rodríguez Morales María de las Mercedes, Cabrerizo Sanz María del Pilar, Matas Avellà Mariona (2013). *Manual de Enfermería en Arritmias y Electrofisiología*. Barcelona. Asociación Española de Enfermería en Cardiología. ISBN 978-84-616-4047-8 Pags. 137-147.
88. Bethesda (1998). *Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults (NHLBI Obesity Education Initiative Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Obesity in Adults (US))*. Report No.: 98-4083.
89. Salas-Salvadó, Rubio, Barbany, Moreno, Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Medicina Clínica.* 2007.128:184-96
90. Abbas, Abul K. & Litchman, Andrew H. (2004), *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid: El Servier España.
91. Akira and Kawai. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004. Vol.4 No. 7, p. 499-511.
92. Kawai and Akira. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation.* 2006. No. 13 Vol. 5, p. 816-825.
93. Cook, Pisetsky, Schwartz. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology.* 2004. Vol. 23, No. 4, p. 975-979.
94. Sánchez, Orozco and Martín. Toll-like receptors and human pathology. *Inmunología* 2004. Vol. 23, No 4, p. 328-338.

95. Bautista, Mosqueda. Role of toll-like receptors in innate immunity and their implication in veterinary medicine. *Vet. Méx.* 2005. Vol 36, No. 4, p. 453-488.
96. Kaufmann. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nature Reviews Microbiology.* 2007. No. 5, p. 491-504.
97. Takeda, Kaisho and Akira. Toll-like receptors. *Annu. Review of Immunology.* 2003. No. 21, p. 335-376.
98. Luke A. J. O'Neill, "Immunity's Early-Warning System", *Scientific American.* 2005. No. 292, p. 38-45.
99. Ziccardi, Nappo, Giugliano, Esposito, Marfella, Cioffi, D'Andrea, Molinari, Giugliano. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002. 19; 105(7): 804-9.
100. Caballero. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res.* 2003. 11(11):1278-89. (Review).
101. Esposito, Pontillo, Di Palo, Giugliano, Masella, Marfella, Giugliano. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial *JAMA.* 2003. 9; 289(14):1799-804.
102. Fantuzzi. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005. 115(5):911-9; (Review).
103. Shi, Inouye, Tzameli, Yin, Flier. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006. 116(11):3015-25.
104. Davis, Gabler, Walker-Daniels, Spurlock. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring).* 2008. 16 (6):1248-55.
105. Kim, Chung, Lee, Paik, Jung, Lee, Chae, Choi. Association between toll-like receptors/CD14 gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in Korean population. *J Korean Med Sci.* 2012. 27(1):72-7.
106. Nishimoto Fukuda, Higashikuni, Tanaka, Hirata, Murata, Kim-Kaneyama, Sato, Bando, Yagi, Soeki, Hayashi, Imoto, Sakaue, Shimabukuro, Sata. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci. Adv.* 2016. 2: 1-11.
107. Nguyen, Favelyukis, Nguyen, Reichart, Scott, Jenn, Liu-Bryan, Glass, Neels, Olefsky. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty

- acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007. 30; 282(48):35279-92.
108. Kim, Choi, Choi, Park. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2010. 113–122
109. Yin, Peng, Wu, Wang, Yao. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and -cell dysfunction *J Leukoc Biol.* 2014; 95(1):47-52 (mini review).
110. Tug, Helmig, Deichmann, Schmeier-Jurchott, Wagner, Zimmermann, Radsak, Giacca and Simon. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *EIR* 21. 2015. 164-173.
111. Mello, Conte. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 2004. 431:338–342.
112. He, Jing and Cheng, MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways. *BioMed Research International.* 2014. 2014; p. 1-14.
113. Carthew, Sontheimer, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2010. 136(4): 642–655.
114. Müller and Imler. Dicing with viruses: microRNAs as antiviral factors. *Immunity.* 2007. 27(1):1-3. **Review.**
115. Benetti, Gonzalo, Jaco, Muñoz, Gonzalez, Schoeftner, Murchison, Andl, Chen, Klatt, Li, Serran Millar, Hannon, Blasco. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol.* 2008. 15(9):998.
116. Sinkkonen, Hugenschmidt, Berninger, Gaidatzis, Mohn, Artus-Revel, Zavolan, Svoboda & Filipowicz. MicroRNAs control *de novo* DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2008. 15(3):259-267.

LITERATURA CITADA EN LA DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

- a) Carlson, Ekelund, Fröberg, Hallberg. Effect of exercise on the elimination of exogenous triglycerides from blood in man. *Acta Med Scand Suppl.* 1967; 472:245-52.
- b) Fröberg and Mossfeldt. Effect of prolonged strenuous exercise on the concentration of triglycerides, phospholipids and glycogen in muscle of man. *Acta Physiol Scand.* 1971 Jun; 82(2):167-71.
- c) Oscai, Patterson, Bogard, Beck, Rothermel. Normalization of serum triglycerides and lipoprotein electrophoretic patterns by exercise. *Am J Cardiol.* 1972. 30(7):775-80.
- d) Hespanhol, Pillay, Van Mechelen, Verhagen. Meta-Analyses of the Effects of Habitual Running on Indices of Health in Physically Inactive Adults. *Sports Med.* 2015. 45(10):1455-68. **Review.**
- e) Bullo, Casas-Agustench, Amigo-Correig, Aranceta and Salas-Salvado. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutrition.* 2006. 10 (10A), 1164–1172.
- f) Esposito, Pontillo, Di Palo, Giugliano, Masella, Marfella, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Journal of the American Medical Association* 2003; 289(14): 1799–804.
- g) Trosheid, Lappegard, Claudi, Damas, Morkrid, Brendberg, et al. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *European Heart Journal* 2004; 25(4): 349–55.
- h) Davis, Gabler, Walker-Daniels, Spurlock. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring).* 2008. 16 (6):1248-55.
- i) Booth, Florida-James, McFarlin, Spielmann, O'Connor, Simpson. The impact of acute strenuous exercise on TLR2, TLR4 and HLA.DR expression on human blood monocytes induced by autologous serum. *Eur J Appl Physiol.* 2010. No. 110, Vol. 6. p 1259-1268.
- j) Flynn, McFarlin, Phillips, Stewart. and Timmerman KL. Toll-Like Receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J. Appl. Physiol.* 2003. No. 95, p. 1833-1842.
- k) Francaux. Toll-like receptor signalling induced by endurance exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009. No.34, Vol.3. p.454-458.
- l) Gleeson M., McFarlin B., Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc. Immunol. Rev.* 2006. No. 12, p. 34-53. **Review.**
- m) Mridha, Haczeyni, Yeh, Haigh, Ioannou, Barn, Ajamieh, Adams, Hamdorf, Teoh, Farrell. TLR9 is up-regulated in human and murine NASH: pivotal role in inflammatory recruitment and cell survival. *Clin Sci (Lond).* 2017. 24; 131 (16):2145-2159.

- n) Nishimoto, Fukuda, Higashikuni, Tanaka, Hirata, Murata, Kim-Kaneyama, Sato, Bando, Yagi, Soeki, Hayashi, Imoto, Sakaue, Shimabukuro, Sata. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2016. 25; 2(3):e1501332.
- o) Hong, Yun, Lee, Park, Kim, Jang. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity (Silver Spring)*. 2015. 23(11):2199-206.
- p) Baggish, Hale, Weiner, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J. Physiol.* 2011. 589.16, 3983–3994.
- q) Urbich, Kuehbachner & Dimmeler. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2008. 79, 581–588.
- r) Thum, Gross, Fiedler, Fischer, Kissler, Bussen, Galuppo, Just, Rottbauer, Frantz, Castoldi, Soutschek, Koteliansky, Rosenwald, Basson, Licht, Pena, Rouhanifard, Muckenthaler, Tuschl, Martin, Bauersachs & Engelhardt. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008. 456, 980–984.
- s) Krichevsky & Gabriely. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J. Cell Mol. Med.* 2009. 13, 39–53.
- t) Chan, Zhang, Hemann, Mahoney, Zweier. & Loscalzo. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab.* 2009. 10, 273–284.

ABREVIATURAS.

Tabla de abreviaturas tesis doctoral		Tabla de abreviaturas tesis doctoral	
miRNAs	Micro RNAs	LDL	Lipoproteína de baja densidad
DNA	Ácido ribonucleico	HDL	Lipoproteína de alta densidad
RNA	Ácido desoxirribonucleico	FC MAX	Frecuencia cardiaca máxima
TLR2	Toll Like Receptor 2	MET	Equivalente metabólico
TLR4	Toll Like Receptor 4	VO2max	Volumen de oxígeno máximo
TLR9	Toll Like Receptor 9	PE	Prueba de esfuerzo
IMC	Índice De Masa Corporal	PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PTGS	Silenciamiento Génico Post-transcripcional	TLR3	Toll Like Receptor 3
TGS	Silenciamiento Génico transcripcional	TLR7	Toll Like Receptor 7
ncRNAs	RNAs no codificantes	TLR8	Toll Like Receptor 8
snRNA	RNAs pequeños nucleares	TIR	Región citoplásmica conocido como Toll/IL-1R
lncRNAs	RNAs largos no codificantes	IL-1	Interleucina-1
siRNAs	RNAs pequeños interferentes	LRRs	Repeticiones en tandem de regiones ricas en leucina
miRNAs	Micro RNAs	LPS	Lipopolisacáridos
mRNA	RNA mensajero	TLR11	Toll Like Receptor 11
hnRNA	RNA heterógeno nuclear	TLR11/12	Toll Like Receptor 11/12
sNRNPs	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares	TLR13	Toll Like Receptor 13
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA	TLR1	Toll Like Receptor 1
dsRNA	RNA de doble cadena	PGN	Peptidoglicanos
poli-A	Poli Adeninas	DC	Células dendríticas
pri-miRNA	Tránsito primario de miRNA	NF-κB	Factor nuclear kappa B
pre-miRNA	Tránsito secundario o intermedio de miRNA	MyD88	Proteína de diferenciación mieloides 88
DNAMT1	DNA metil transferasa 1	TRIF	Adaptador del contenedor de dominio de TIR inducido por IFNβ
DNMT3A	DNA metil transferasa 3A	IFNβ	Interferón beta
DNMT3B	DNA metil transferasa 3B	IL-1	Interleucina 1
DNAMT's	DNA metil transferasas	IL-8	Interleucina 8
OMS	Organización Mundial de la Salud	IL-12	Interleucina 12
DT2	Diabetes Mellitus tipo 2	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
ENSANUT 2006	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006	VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana del tipo 1
ENSANUT MC 2016	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición a Medio Camino 2016	HSP	Proteína de choque térmico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	VSV	Virus de la estomatitis vesicular
NOM043	Norma Oficial Mexicana 043	ssRNA	RNA viral de cadena sencilla
TF's	Factores Transcripcionales	IRAK-1	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
ENSANUT 2012	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012	TIRAP	Proteína adaptadora que contiene el dominio de tirosina
ATP	Adenosín trifosfato	Tollip	Proteína intercambiante de Toll
NPM	Número máximo de pulsaciones por minuto	IRAK-4	Cinasa asociada al receptor de interleucina 4
PPARγ	Receptor de proliferación de peroxisomas gama	TRAF6	Receptor 6 asociado al factor de necrosis tumoral
PPARβ/δ	Receptor de proliferación de peroxisomas beta/delta	MAP3K	Triple pteín cinasa activada por mitógeno
PEPCK	Fosfoenol piruvato caboxinasa	TAK1	Factor-β (TGF-β)-de crecimiento transformante de TLR1 activado por cinasa
O2	Oxígeno	IKK	Inhibidor KB de cinasa
		TRAM	Molécula adaptadora relacionada con TRIF

Tabla de abreviaturas tesis doctoral	
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con TRIF
IRF3	Factor regulador de interferón 3
VCAM-1	Proteína de adhesión celular vascular 1
IL-6	Interleucina 6
FFAs	Ácidos grasos libres
HSP60	Proteína de choque térmico 60
HSP70	Proteína de choque térmico 70
cfDNA	DNA celular libre
ESM	Escuela Superior de Medicina
ISAK	Sociedad internacional para el avance de la kineantropometría
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
RPM	Revoluciones por minuto
IPN	Instituto Politécnico Nacional
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

ANEXOS.

Fecha: ____/____/____.

Nombre: _____ ID: _____.

Edad: _____. Sexo: _____. IMC: _____. Peso: _____. Talla _____.

PA inicial: _____. PA Habitual: _____.

FC máx.=	75%=	70%=	65%=	60%=
----------	-------	------	-------	------	-------	------	-------	------	-------

PRUEBA DE ESFUERZO –BRUCE AJUSTADO-

Periodo	Inclinación	Inclinación equipo	Velocidad Millas	Velocidad kilómetros	Tiempo	Frecuencia Cardiaca	Presión Arterial	VO ²
½	0	0	1.4	2.2	0-3			
1	5	1	1.7	2.7	03-jun			
1 ½	10	2	2.1	3.4	06-sep			
2	10	2	2.5	4	09-dic			
2 ½	12	2	2.9	4.7	dic-15			
3	12	2	3.4	5.5	15-18			
3 ½	14	2	3.8	6.1	18-21			
4	14	2	4.2	6.8	21-24			
4 ½	16	2	4.6	7.4	24-27			
5	18	3	5	8	27-30			

PROGRAMA DE EJERCICIO –SAYUKI-

Etapa	Velocidad mph	Velocidad km/h	Tiempo
Calentamiento	2.3	3.7	0-3
1	2.5	4	3-6
2	2.7	4.3	6-9
3	2.9	4.6	9-12
4	3	4.9	12-15
5	3.2	5.2	15-18
6	3.4	5.5	18-21
7	3.6	5.8	21-24
8	3.8	6.1	24-27
9	4	6.4	27-30
10	4.1	6.6	30-33
11	4.2	6.8	33-36
12	4.3	7	36-39
13	4.5	7.2	39-42
Enfriamiento	2.3	3.7	42-45

PROGRAMA DE EJERCICIO

Semana

No. Sesión	Fecha	Frecuencia cardiaca														FC Max Prom	PAI	PAF	Kcal totales		
1																					
2																					
3																					

Semana

No. Sesión	Fecha	Frecuencia cardiaca														FC Max Prom	PAI	PAF	Kcal totales		
1																					
2																					
3																					

Semana

No. Sesión	Fecha	Frecuencia cardiaca														FC Max Prom	PAI	PAF	Kcal totales		
1																					
2																					
3																					

Semana

No. Sesión	Fecha	Frecuencia cardiaca														FC Max Prom	PAI	PAF	Kcal totales		
1																					
2																					
3																					

Pliegue Supraileaco									
Pliegue Subescapular									

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Parámetro	Valores de referencia	Valor inicial			
Fecha					
Aspartato amino transferasa (AST)	13-39 IU/L				
Alanino amino tranferasa (ALT)	7-52 IU/L				
Bilirrubina Total (BT)	0.3 – 1.00 mg/dL				
Bilirrubina Directa (BD)	0.03 – 0.018 mg/dL				
Bilirrubina Indirecta (BI)	0.27-0.82 mg/dL				
Glucosa	70-105 mg/ dL				
Colesterol Total	<200 mg / dL				
Colesterol HDL	40-60 mg/ dL				
Colesterol LDL	<100				
Triglicéridos	150 mg/dL				

HISTORIA CLÍNICA

Nombre: _____.

Edad: _____. Fecha de nacimiento: ____/____/_____.

Sexo: _____ Edo. Civil: _____.

Ocupación: _____.

Dirección: _____
_____.

Teléfono: () _____ . Otros (Fax/E-mail) _____.

ANTECEDENTES SALUD / ENFERMEDAD

PROBLEMAS ACTUALES

Diarrea: _____ Estreñimiento: _____ Gastritis: _____ Úlcera: _____

Náusea: _____ Pirosis: _____ Vómito: _____ Colitis: _____

Dentadura: _____ Otros _____

Observaciones _____
_____.

Padece alguna enfermedad diagnosticada:

Ha padecido alguna enfermedad importante: _____

Toma algún medicamento ____ Cuál _____

_____ Dosis _____ Desde cuándo _____

Toma: Laxantes _____ Diuréticos _____ Antiácidos _____ Analgésicos _____

Le han practicado alguna cirugía: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Obesidad __ Diabetes __ HTA __ Cáncer __ Hipercolesterolemia __ Hipertrigliceridemia __

ASPECTOS GINECOLÓGICOS

Anticonceptivos orales: SI _ NO _ .

Cuál: _____ . Dosis _____ .

Climaterio SI _ NO _ Fecha _____

Terapia de reemplazo hormonal: SI _ NO _

Cuál _____

Dosis _____

ACTIVIDAD FÍSICA:

Muy ligera ____ Ligera ____ Moderada ____ Pesada ____ Excepcional ____

Ejercicio:

Tipo _____ Frecuencia _____ Duración _____ ¿Cuándo inicio? _____.

Consumo de (frecuencia y cantidad):

Alcohol: _____ Tabaco: _____ Café: _____

HISTORIA DE PESO CORPORAL

- | |
|---|
| <p>1. ¿Acostumbra pesarse? Si () No ()</p> <p>¿Con que frecuencia? _____</p> <p>a) ¿Ha tenido problemas con su peso? Si () No ()</p> <p>Marque () bajo peso () sobrepeso () obesidad () inestabilidad</p> <p>b) ¿Cuándo inicia su problema? _____</p> <p>¿Cuál ha sido su peso máximo alcanzado? _____ ¿Cuándo? _____</p> <p>¿Cuál ha sido su peso habitual? _____</p> <p>¿Cuál ha sido su peso mínimo alcanzado? _____</p> <p>¿Cuál es el que considera ideal para usted? _____</p> |
|---|

RECORDATORIO DE 24 HORAS

Alimento	Cantidad
Desayuno:	
Colación matutina:	
Comida:	
Colación vespertina:	
Cena:	
Dulces:	
Agua:	

NECESIDADES ENERGÉTICAS Y NUTRIMENTALES

Requerimiento Calórico Total: _____ Kcal

Requerimiento Hídrico: _____ ml al día

NUTRIMENTO		Porcentaje	GRAMOS	KILOCALORIAS
Hidratos de carbono	Simples	35%		
	Complejos	15%		
Proteínas		20%		
Lípidos	Poliinsaturado y Monoinsaturado	23%		
	Saturados	7%		

Registro de Requerimiento Calórico

FECHA	KCAL

DIAGNÓSTICO NUTRIOLÓGICO FINAL

DIETA

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
DESAYUNO	Quesadillas con pico de gallo: 2 tortillas de maíz, ½ taza pico de gallo, y 80g de queso panela 1 vaso de leche descremada 1 manzana	Tostadas de pollo Tostadas 2 pzas. Frijoles con 40g de queso Pollo 40g Lechuga con jitomate 1 papa picada Te de limón	Chilaquiles: Tortillas 2pzas Salsa verde o roja 40g de queso panela ½ de manzanilla Melón picado 1 taza	Omelette de champiñones: 2Claras de huevo ½ taza de champiñones Licuado de fresas Leche descremada 1 taza Fresa 6 pzas	Sandwich de jamón Pan integral 2 pzas. 1 reb. de jamón de lechuga, jitomate y cebolla Té de canela 1 tra Guayaba mediana 2 pzas	Mollejes Bollo 1 pza Frijoles, queso panela 40 gr. pico de gallo 1 taza Leche descremada 1 taza	Rollos de jamón Jamón 2 pzas Verduras mixtas ½ taza Naranja en gajos 1 pza Té de limón Galletas integrales 4pzas
COLACIÓN MAÑUTINA	Melón con yogur: 1 taza de melón picado 240 ml de yogur natural	Jicama con zanahoria rayada 1taza	Naranja 1 pza 3nueces	Pepino rayado 1 taza	Papa 1 pza Nuez 3 pzas	Piña picada 1 taza	Pepino y zanahoria rayada 1taza
COMIDA	sopa de verduras 1 taza Filete de pescado: 120 g de filete 1/3 de taza de frijoles medidos Verduras al vapor: 1 taza Choyote, zanahoria y ejote. Tortillas 1pza Agua de Jamaica s/azúcar	½ taza de sopa de fideo Fideos de res a la mexicana: Bistec de res 120g Jitomate, cebolla ½ taza 1 cdita de aceite de oliva Tortillas 1pza Agua de naranja s/azúcar	Sopa: Calabacitas y champiñones 1 taza Caldo de pollo 1 taza Pollo a la cazuela 1 pienza Chicharos, nopales, zanahoria Tortillas de maíz 1 pza Agua de limón	Sopa de champiñones Champiñones 1/3 taza Con caldo de pollo Tostadas de ensalada de alitas Tostadas 2 pzas. Alun ½ taza Verduras 1 taza Mayones light 1 cucharadita Agua de sandía	Sopa de codito: Codito ½ taza Cebolla y ajo para sazonar Pechuga asada: Pechuga 120 grs. Ensalada fresca Nopales, espinaca, zanahoria Tortilla 1 pza Agua de limónado	Sopa de friebos: Habas hervidas 1taza Salpicón de res: Carne de res molida 120g Zanahoria, chicharo, ejote, brócoli, jitomate 1 tra 1 cdita de aceite de oliva Tortillas 1 pza Agua de mandarina 1pza	Espagueti rojo 1/2taza Pescado empapelado: Filete de pescado 120 grs Jitomate, cebolla y Chile moran ½ taza Verduras al vapor: Zanahoria, ejote, nopales Frijoles de la olla ½ taza Tortillas 2pzas
COLACIÓN VESPERTINA	1 Barra de avena o amaranto	Avena: Yogur natural ½ taza de avena	Pepino y zanahoria rayada 1 taza	Ensalada de nopales a la mexicana 1taza	Jicama rayada 1 taza	Cacahuates 10 pzas Agua de limón	Quesadilla de pollo Tortilla 1pza Aguacate 1 reb Pollo 40g Ejote 1/4taza
CENA	Quesadilla de pollo: Tortillas 2 Pollo deshebrado Espinaca cocida ¼ taza 1 cdita de aceite de oliva Papaya picada 1 taza Agua de limón s/azúcar	Tostadas: 2 tostadas de maíz 2 cditas de frijoles 40 g de queso panela Lechuga Jitomate 1pza 1 Mandarina	Choyote al vapor: Choyote 1 pza Queso fresco 40g Galletas hebranas 4 pzas Papa 1 pza Yogur para beber con frutas bajo en calorías	Dobladillo: Calabacita cocida y picada 1 pza 1 cdita de aceite Ejote y cebolla para sazonar Pollo hervido 60g Tortilla de maíz 2 pzas Yogur 240ml con 10 pzas de panitos	Leche descremada 1 taza Ensalada de pollo con verduras: Pollo 60g Ejote ½ taza Pan integral 1 reb Durazno 2 pzas	Yogur light 1 taza Fresas 1taza Pan tostado 1pza Queso panela 40g Jitomate y 1 reb de aguacate	Cereal: Cereal integral en hojuelas 1 taza Leche descremada 1taza Almendras 4cditas Uvas 10pzas