



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL EFECTO DEL ÁCIDO GRASO *TRANS*-PALMITOLEICO
SOBRE LA ADIPOSIDAD Y EL METABOLISMO DE LÍPIDOS
EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD INDUCIDA POR
DIETA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

LIDIA IRASEMA CHÁVARO ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIA EUGENIA FRGOLET VAZQUEZ VELA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
VOCAL: TANIA GÓMEZ SIERRA
SECRETARIO: MARÍA EUGENIA FRIGOLET VÁZQUEZ VELA
1er. SUPLENTE: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ
2do. SUPLENTE: ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.
LABORATORIO DE ENFERMEDADES METABÓLICAS: OBESIDAD Y
DIABETES.**

ASESORA DEL TEMA:

Dra. María Eugenia Frigolet Vázquez Vela

SUSTENTANTE:

Lidia Irasema Chávaro Ortiz

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | |
| 1.1 Obesidad y sobrepeso | 3 |
| 1.2 Tejido adiposo blanco y metabolismo de lípidos | 7 |
| 1.3 Estrategias de tratamiento de la obesidad | 17 |
| 1.4 Ácido graso <i>trans</i> -palmitoléico | 19 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 22 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 24 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 24 |
| 5.1 Objetivos particulares | 24 |
| 6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA | 25 |
| 6.1 Experimentación en modelo <i>in vivo</i> | 26 |
| 6.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina..... | 26 |
| 6.3 Determinación de insulina en suero | 27 |
| 6.4 Determinación de la composición corporal y obtención de tejidos | 27 |
| 6.5 Extracción y evaluación de integridad de RNA | 28 |
| 6.6 Evaluación de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos | 28 |
| 6.7 Análisis estadístico | 29 |
| 7. RESULTADOS | |
| 7.1 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina iniciales | 30 |
| 7.2 Tratamiento con dietas experimentales | 32 |

| | |
|---|----|
| 7.3 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina finales | 34 |
| 7.4 Determinación de la composición corporal | 37 |
| 7.5 Extracción y evaluación de integridad de RNA | 40 |
| 7.6 Evaluación de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos | 41 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 46 |
| 9. CONCLUSIONES | 56 |
| 10. PERSPECTIVAS | 58 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 59 |
| 12. ANEXO I. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS DE TRABAJO | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| AF1/2 | Dominio de la Función de Activación 1/2 |
| ATGL | Adiposo Triacilglicéridos Lipasa |
| C | Dieta Control |
| CTP | Dieta Control adicionada con <i>trans</i> -palmitoleico |
| DMT2 | Diabetes Mellitus Tipo 2 |
| FABP4 | Proteína 4 de Unión a Ácidos Grasos |
| FATP | Proteína Transportadora de Ácidos Grasos |
| GLUT4 | Transportador de Glucosa Tipo 4 |
| GTT | Curva de Tolerancia a la Glucosa |
| H | Dieta Alta en Lípidos |
| HDL | Lipoproteína de Alta Densidad |
| HSL | Lipasa Sensible a Hormonas |
| HTP | Dieta Alta en Lípidos adicionada con <i>trans</i> -palmitoleico |
| IMC | Índice de Masa Corporal |
| ITT | Curva de Tolerancia a la Insulina |
| LDL | Lipoproteína de Baja Densidad |
| MGL | Lipasa de Monoacilglicéridos |
| PEPCK | Fosfoenol Piruvato Carboxicinasa |
| PPAR γ | Receptor γ Activado por el Proliferador de Peroxisomas |
| qPCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa |
| RXR | Receptor X Retinoide |
| SCD1 | Esteraroil CoA Desaturasa 1 |
| TAE | Tejido Adiposo Epididimal |
| TAM | Tejido Adiposo Mesentérico |
| TP | Ácido graso <i>trans</i> -palmitoleico |
| TZD | Tiazolidinedionas |
| UCP1 | Proteína Desacoplante 1 |

RESUMEN

La obesidad es un padecimiento caracterizado por la acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que puede tener un efecto perjudicial para la salud. En México, la prevalencia de obesidad y sobrepeso en la población adulta es de 72.5%. La obesidad abdominal es uno de los componentes del síndrome metabólico, el cual incrementa el riesgo de desarrollar Diabetes Mellitus Tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Se ha propuesto generar conocimientos sobre la influencia de ciertos nutrimentos en el metabolismo con la finalidad de promover mejoras en el perfil cardio-metabólico. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del ácido graso *trans*-palmitoleico sobre la adiposidad, el metabolismo de lípidos y de glucosa en un modelo murino de obesidad inducida por dieta. Los ratones C57BL/6 se alimentaron con dietas con diferente aporte energético por lípidos (control, C, con 10% de aporte energético por lípidos y alta en lípidos, H, con 45%) con y sin la adición de ácido *trans*-palmitoleico. Los ratones con la dieta HTP (alta en lípidos con adición de *trans*-palmitoleico) redujeron el 17.33% del peso corporal, con respecto al grupo H. En estos grupos, la alimentación con estas dietas estableció un estado de intolerancia a la glucosa sin presentar resistencia a la insulina. El peso del tejido adiposo mesentérico del grupo HTP fue estadísticamente menor en comparación con el grupo H. Durante la evaluación de la expresión relativa de genes asociados al metabolismo de lípidos se determinó que la expresión de PPAR γ (asociado a la adipogénesis) presentó tendencia a ser mayor en el grupo HTP. La expresión de PEPCCK (asociado a la lipogénesis) presentó diferencia significativa entre los grupos H y HTP, sugiriendo que la gliceroneogénesis está sobre expresada cuando se administra *trans*-palmitoleico. Con base en estos resultados, se concluye que el *trans*-palmitoleico favorece la disminución de la adiposidad en ratones

alimentados con una dieta alta en lípidos, sin prevenir el desarrollo de intolerancia a la glucosa. Así mismo, promueve modificaciones en la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos, sin embargo, no explican de forma concluyente la reducción en la adiposidad. Por lo que se debe evaluar otras enzimas y sus mecanismos de regulación, así como otras vías metabólicas, que aporten evidencia del papel que cumple en el metabolismo de lípidos.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Obesidad y sobrepeso

En términos generales, se ha descrito que la obesidad es un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético (Figura 1), que resulta si la ingesta excede o supera al gasto durante un periodo de tiempo significativo (Ojha & Budge, 2014).

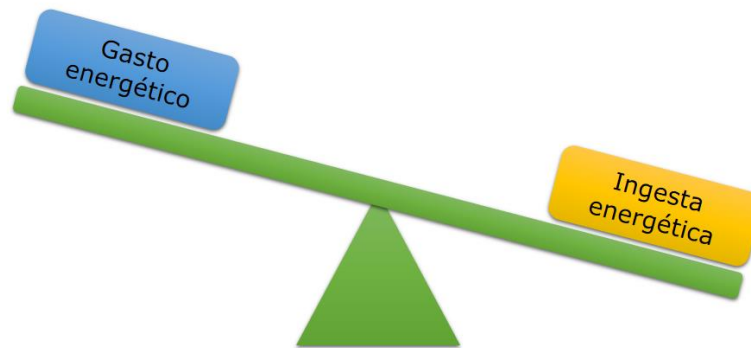


Figura 1. Balance energético positivo cuando la ingesta energética es mayor al gasto energético (Adaptado de Ojha & Budge, 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), la obesidad y el sobrepeso se definen como enfermedades sistémicas caracterizadas por la acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo que conlleva efectos adversos a la salud, tales como el desarrollo de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), enfermedades cardiovasculares y desarrollo de patologías en hígado y riñón (Abdelaal *et al.*, 2017).

Se ha reportado un aumento en el riesgo de desarrollo de algunos tipos de cáncer como el de mama y el colorrectal, debido al establecimiento de un estado crónico de inflamación y la consecuente desregulación en la secreción de citocinas proinflamatorias (Kolb *et al.*, 2016).

Los padecimientos asociados a la obesidad fueron las principales causas de mortalidad en México durante el 2016. De acuerdo con cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2017), las enfermedades isquémicas del corazón fueron la primera causa de muerte, seguido por la DMT2 y la presencia de tumores malignos.

La tendencia global al desarrollo de obesidad (Figura 2) ha sido un fenómeno creciente a nivel mundial que ha presentado un mayor incremento en los últimos diez años pasando de 10.1% en 2006 hasta 13.1% en 2016, en comparación con la década de 1990-2000, periodo en el que el incremento fue del 1.9% (WHO, 2017).

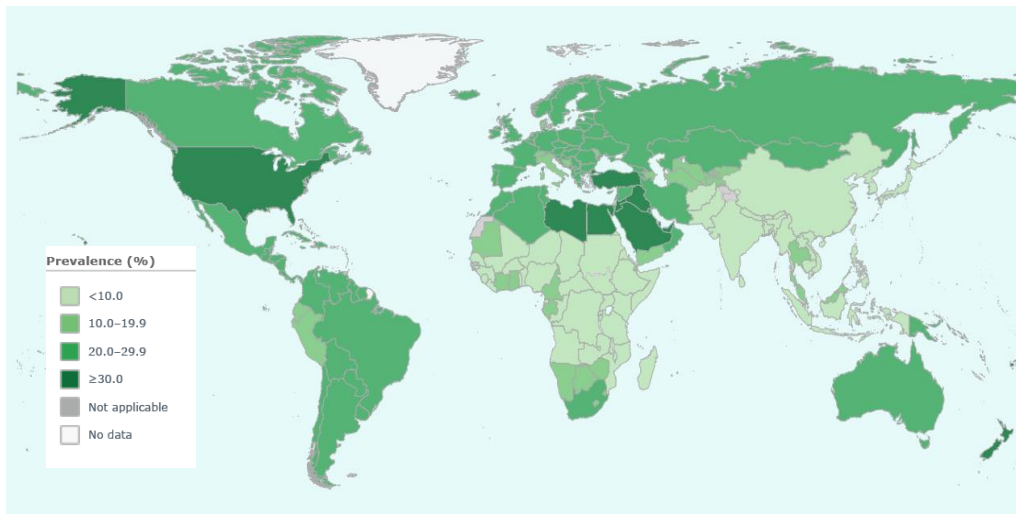


Figura 2. Prevalencia de obesidad considerando un Índice de Masa Corporal (IMC) ≥ 30 en adultos mayores de 18 años en 2016 (WHO/GHO, 2017).

De forma similar, la tendencia global en el desarrollo de sobrepeso (Figura 3) ha aumentado en mayor proporción en los últimos años. En el periodo comprendido de 2006 a 2016, la tendencia de sobrepeso en población adulta paso de 33.6% a 38.9% (WHO, 2017).

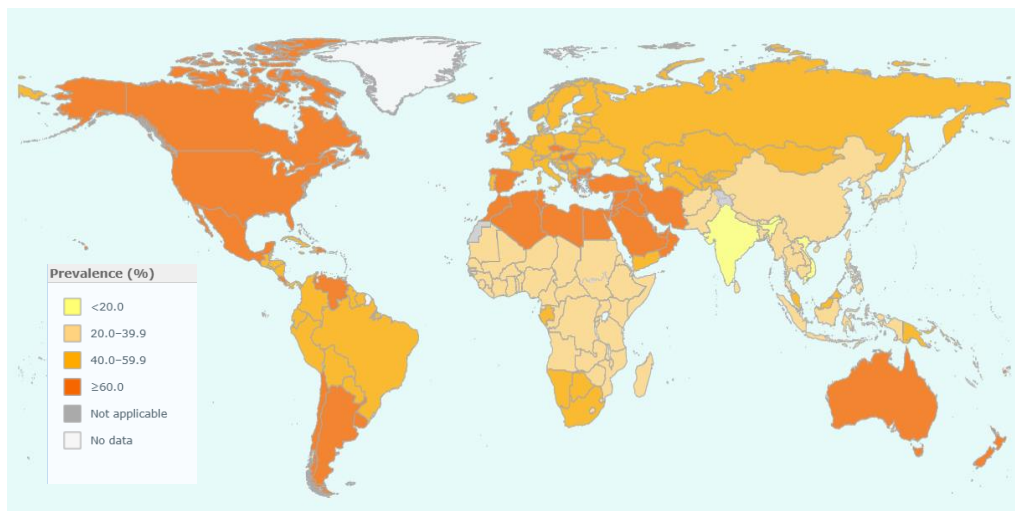


Figura 3. Prevalencia de sobrepeso (IMC \geq 25) en adultos mayores de 18 años en 2016 (WHO/GHO, 2017).

En México la prevalencia de obesidad y sobrepeso en niños de etapa escolar (5 a 11 años) fue de 33.2% en el 2016, en adolescentes (12 a 19 años) de 36.3% (SSA, 2016).

En la población adulta (mayores de 20 años), la prevalencia conjunta de obesidad (tipo I, II y III) y sobrepeso fue de 72.5% en el mismo año; de este grupo, el 38.8% tiene sobrepeso y el 32.4% es obeso en alguno de los tres niveles (SSA, 2016).

Estas tendencias colocaron a México como el segundo país en índice de sobrepeso del continente americano sólo por debajo de los Estados Unidos de América, y el cuarto en índice de obesidad en el año 2016 (WHO/GHO, 2017).

Una de las enfermedades que está relacionada con la obesidad es la DMT2. La relación entre éstas se ha conocido por décadas y se ha descrito como el eje adipoinsulina, debido a la fuerte relación que se ha observado entre el aumento de la masa grasa y la resistencia a la insulina sistémica (Khan & Flier, 2000).

La resistencia a la insulina en la obesidad se manifiesta por un decremento en el transporte y metabolismo de glucosa estimulado por insulina, en adipocitos y músculo esquelético. Así como el deterioro en la secreción de glucosa hepática (Khan & Flier, 2000). Se han propuesto dos vías por las cuales el metabolismo de lípidos conduce al desarrollo de resistencia a la insulina. En primer lugar, el incremento de ácidos grasos libres circulantes puede activar vías de señalización celulares que interfieren con la actividad de la insulina. Por otro lado, el metabolismo de lípidos lleva a la acumulación de productos lipídicos intracelulares, que causan la resistencia a la insulina (Johnson & Olefsky, 2013).

Junto con otras alteraciones en la vía de señalización de la insulina, como la regulación negativa del transportador de glucosa tipo 4 (Glucose Transporter Type 4, GLUT4), se favorece la desestabilización en la homeostasis de la glucosa. En conjunto, estas modificaciones influyen en el desarrollo de la DMT2 (Khan & Flier, 2000).

Un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo en el desarrollo de resistencia a la insulina aumenta conforme incrementa el tejido adiposo blanco (Patel & Abate, 2013). Es debido a la firme relación entre la adiposidad y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, que el tratamiento y prevención de la obesidad tienen mayor relevancia.

1.2 Tejido adiposo blanco y metabolismo de lípidos

El tejido adiposo blanco es un tejido complejo y heterogéneo formado por diversos tipos celulares, siendo los principales los adipocitos, preadipocitos y células del sistema inmune (Figura 4) (Matafome & Seíça, 2017). También hay presencia de vasos sanguíneos, preadipocitos y células endoteliales. En estado saludable, este tejido se caracteriza por presentar niveles elevados de linfocitos T reguladores (Células T_{Reg}) y macrófagos del tejido adiposo (Macrófagos M2) con baja infiltración de células proinflamatorias (Kusminski *et al.*, 2016).

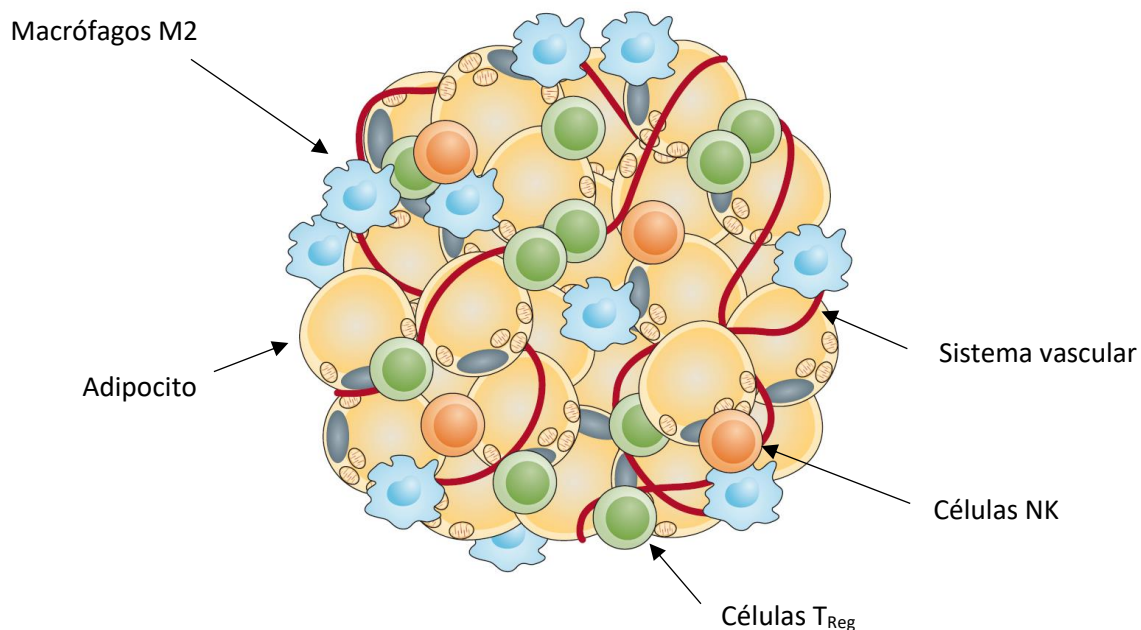


Figura 4. El principal tipo celular que conforma al tejido adiposo es el adipocito. Células T_{Reg} (Linfocitos T reguladores), Macrófagos M2 (Macrófagos del tejido adiposo), Células NK (Células *Natural Killer*) (Kusminski *et al.*, 2016).

La principal función de este tejido es la homeostasis energética, mediante el almacenamiento y liberación de lípidos en forma de triacilglicéridos en la vacuola lipídica de los adipocitos (Figura 5).

También presenta funciones mecánicas de protección y funciones endócrinas, debido a la secreción de hormonas y citocinas como la leptina y adiponectina (Trayhurn & Beattie, 2001; Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014).

Los adipocitos blancos contienen una sola vacuola lipídica (uniloculares) de gran tamaño que ocupa el mayor volumen de la célula y contiene más del 90% de triacilglicéridos del total de lípidos que almacena. El núcleo y otros organelos, como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico liso y rugoso y las mitocondrias son desplazados a la periferia (Body, 1988; Wronska & Kmiec, 2012).

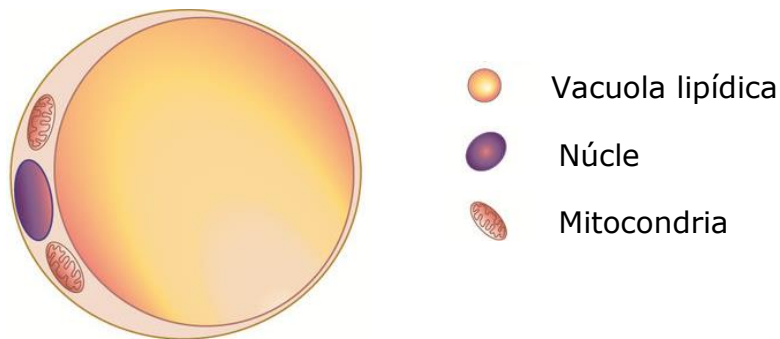


Figura 5. Estructura celular de los adipocitos blancos (Body, 1988; Wronska & Kmiec, 2012).

Para lograr la homeostasis energética, el tejido adiposo regula las vías de lipólisis y lipogénesis de forma eficiente respondiendo a las condiciones energéticas. En primer lugar y durante un periodo de ayuno prolongado, los niveles de glucosa en sangre disminuyen. Esto estimula la secreción de hormonas norepinefrina y glucagón, las cuales activan la movilización de los triacilglicéridos almacenados en los adipocitos (Nelson *et al*, 2014).

La movilización de triacilglicéridos conlleva a su utilización en el tejido adiposo, en hígado o en músculo por medio de un fenómeno conocido como lipólisis. Esta ruta metabólica única de los adipocitos tiene lugar en la superficie de la vacuola lipídica y se sabe que tres enzimas están involucradas en la liberación de tres moléculas de ácido graso libre y una molécula de glicerol a partir de los triacilglicéridos almacenados en el tejido adiposo (Kolditz & Langin, 2010).

La lipólisis inicia por la hidrólisis de triacilglicéridos a diacilglicéridos catalizada por la adiposo triacilglicéridos lipasa (Adipose Triglyceride Lipase, ATGL). Posteriormente la lipasa sensible a hormonas (Hormone-Sensitive Lipase, HSL) hidroliza los diacilglicéridos a monoglicéridos y, finalmente la lipasa de monoacilglicéridos (Monoacylglycerol Lipase, MGL) libera el tercer ácido graso y el glicerol (Ahmadian *et al*, 2010).

En respuesta al consumo de alimento, la energía se recolecta en forma de ácidos grasos libres provenientes de la dieta o de la lipogénesis *de novo*. Los ácidos grasos libres exógenos ingresan al adipocito mediante las proteínas transportadoras de ácidos grasos (Fatty Acid Transport Protein, FATP) que, junto con los ácidos grasos sintetizados en el adipocito, se utilizan en la síntesis de triacilglicéridos. Se requieren tres ácidos grasos libres que se esterifican en un esqueleto de glicerol y son procesados en el retículo endoplásmico para su almacenamiento dentro de la vacuola lipídica. Esta ruta metabólica se conoce como lipogénesis (Rutkowski *et al.*, 2015).

El consumo crónico de energía da como resultado la expansión del tejido adiposo y esto puede deberse al aumento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o el aumento en el número de adipocitos (hiperplasia). La expansión por aumento en el número de adipocitos maduros es conocida como adipogénesis. Los preadipocitos se diferencian

a adipocitos maduros mediante la activación del regulador principal, pero no exclusivo, PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) (Rutkowski *et al.*, 2015). PPAR γ es un factor de transcripción necesario para la regulación de la sensibilidad a la insulina, lipogénesis, supervivencia y función de los adipocitos (Grygiel-Górniak, 2014). Controla la activación transcripcional del proceso de adipogénesis a través de la unión de ligandos y la interacción selectiva con correpresores y coactivadores de la transcripción (Ma *et al.*, 2018).

PPAR γ se une al DNA como heterodímero con RXR (Retinoid X Receptor) en secuencias consenso que contienen dos repeticiones directas de la secuencia AGGTCA separadas por un solo nucleótido. En presencia de un agonista, el dominio AF2 facilita el reclutamiento de coactivadores y mediadores, llevando al incremento en la expresión de genes blanco (Figura 6, Lefterova *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018).

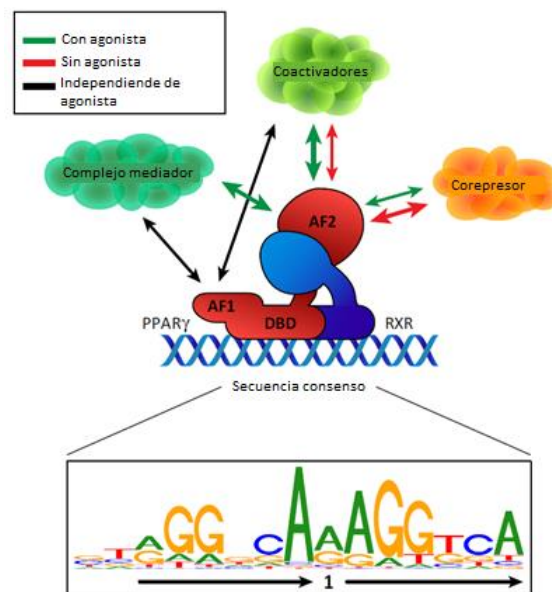


Figura 6. Mecanismo de unión a DNA de PPAR γ . Principales dominios estructurales de la proteína PPAR γ : Dominio de la función de activación 1 (AF1) N-terminal, dominio de unión al DNA (DBD) y dominio AF2 C-terminal (Adaptado de Lefterova *et al.*, 2014).

Se han descrito diversos ligandos para PPAR γ , tanto naturales como los ácidos grasos insaturados, como sintéticos tales como las tiazolidinedionas (TZD). El *cis*-palmitoleico es uno de los ácidos grasos que se ha descrito como ligando de este factor de transcripción (Xu *et al.*, 1999).

Algunos de los genes blancos de PPAR γ que se han reportado y que resultan de gran importancia en este trabajo son FABP4, UCP1 y PEPCK (Figura 7).

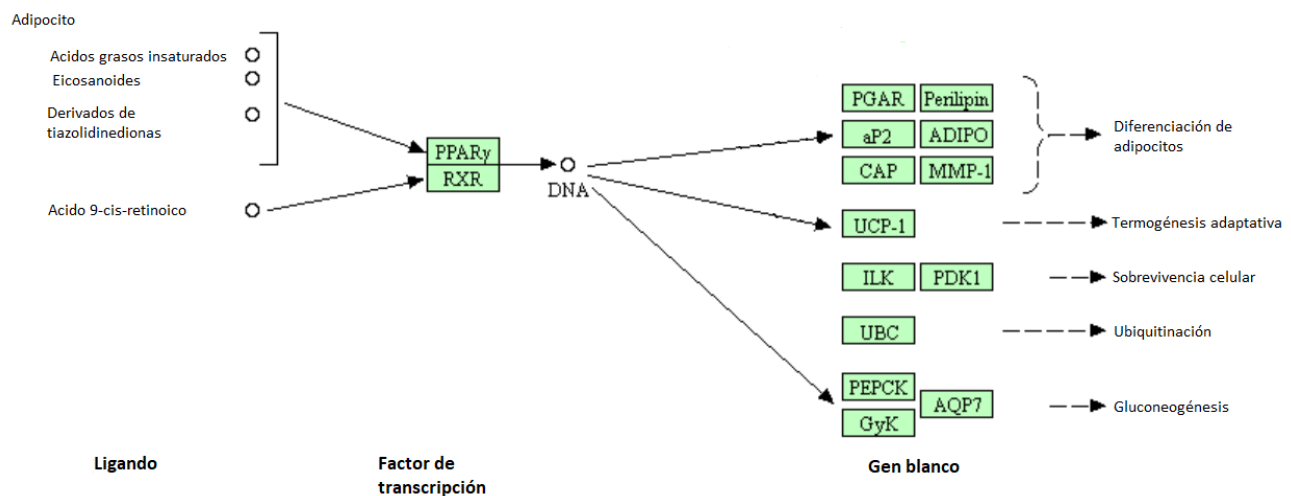


Figura 7. PPAR γ es parte de la familia de receptores nucleares activados por ácidos grasos y sus derivados. Este factor de transcripción promueve la expresión de genes asociados a la diferenciación de adipocitos, la termogénesis adaptativa y la gluconeogénesis en los adipocitos (Adaptado de KEGG, 2106).

La proteína 4 de unión a ácidos grasos (Fatty Acid Binding Protein 4, FABP4), también conocida como aP2 es una proteína citoplásmica involucrada en la lipólisis (Figura 8). Actúa como molécula chaperona, transportando una molécula de ácido graso libre generado desde la vacuola lipídica, hacia el exterior de la célula (Nielsen *et al.*, 2014).

En estudios con líneas celulares, se ha demostrado que los adipocitos deficientes de FABP4 presentan eficiencia reducida en la lipólisis. En estudios con ratones deficientes de FABP4 se ha reportado que presentan un aumento en el peso corporal, que coincide con menor resistencia a la insulina, tanto en ratones con obesidad inducida por dieta, como con modelos de ratones genéticamente obesos (Furuhashi *et al.*, 2014).

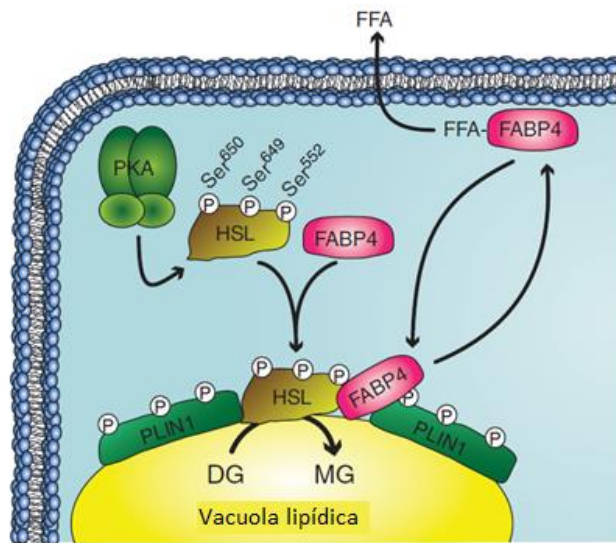


Figura 8. Función de FABP4 durante la lipólisis en adipocitos. La activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) mediante fosforilación conlleva a la asociación con FABP4 y la traslocación del complejo a la superficie de la vacuola lipídica. FABP4 se asocia a los ácidos grasos liberados por HSL y los transporta desde la vacuola lipídica hacia la membrana plasmática del adipocito (Adaptado de Nielsen, 2014).

Cao y colaboradores en 2008 observaron que la chaperona de lípidos tiene un efecto profundo en el metabolismo de lípidos sistémico y la ausencia de esta proteína en el tejido adiposo ocasiona cambios globales en los perfiles lipídicos de varios tejidos. Así mismo, observaron que los ratones deficientes de FABP4 presentaron mayores concentraciones de palmitoleato en el tejido adiposo como ácido graso

libre, formando triacilglicéridos, diacilglicéridos y fosfolípidos (Cao *et al.*, 2008).

El palmitoleato es un ácido graso único que sirve como marcador de la lipogénesis *de novo*, un proceso por el cual se obtienen ácidos grasos a partir de glucosa (Cao *et al.*, 2008). Este ácido graso se obtiene al final de la lipogénesis por la acción de la estearoil CoA desaturasa o SCD1 (Stearoyl-coenzyme A desaturase 1), la cual es una enzima lipogénica reguladora de esta vía metabólica (ALJohani *et al.*, 2017). Esta enzima introduce un doble enlace *cis* en la posición 9, 10 de sustratos estearoil-CoA para formar oleoil-CoA. Se ha demostrado que SCD1 utiliza los ácidos grasos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) para obtener palmitoleato (C16:1n-7) y oleato (C18:1n-9) (Miyazaki *et al.*, 2006).

Los ácidos grasos monoinsaturados sintetizados por SCD1 (Figura 9) son utilizados como el sustrato principal para la síntesis de diversos lípidos incluyendo fosfolípidos para la formación de membranas y triacilglicéridos para almacenar sustratos energéticos en los adipocitos (Ntambi & Miyazaki, 2004).

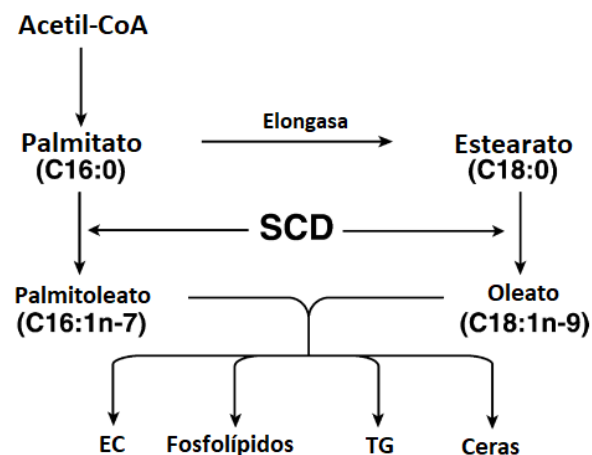


Figura 9. Papel de la SCD1 en la síntesis de lípidos. El *cis*-palmitoleico (palmitoleato) y el *cis*-oleico (oleato) obtenidos son utilizados en la síntesis de ésteres de colesterol (EC), fosfolípidos, triacilglicéridos (TG) y ceras (Adaptado de Ntambi & Miyazaki, 2004).

SCD1 logra desaturar ácidos grasos por medio de un sistema de enzimas ancladas al retículo endoplásmico que participa en la desaturación de ácidos grasos saturados está conformado por tres proteínas: NADH-citocromo b5 reductasa, citocromo b5 y estearoil CoA desaturasa. La transferencia de electrones a partir del NADH, pasando por el sistema citocromo b5 finaliza con la inserción de un doble enlace en la cadena del ácido graso saturado y la liberación de dos moléculas de agua (Figura 10) (Voet *et al.*, 2011).

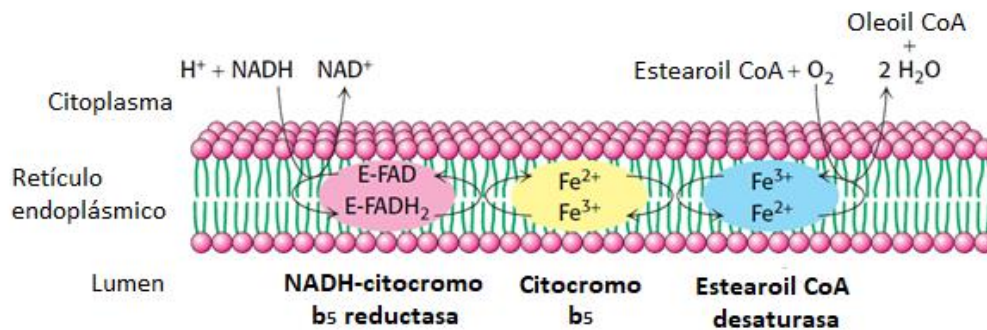


Figura 10. Sistema de enzimas ancladas al retículo endoplásmico que participa en la desaturación de ácidos grasos saturados (Adaptado de Berg *et al.*, 2015).

En estudios con cultivo celular de preadipocitos los cuales son sometidos a estímulos adipogénicos, se ha observado aumentos en casi todas las enzimas celulares requeridas en la síntesis de ácidos grasos, entre estas SCD1 (Kim & Ntambi, 1999).

Otra enzima que está involucrada en la lipogénesis del tejido adiposo es la fosfoenol piruvato carboxicinasas (PEPCK) (Figura 11). Esta enzima genera glicerol-3-fosfato, que puede utilizarse en la esterificación de los ácidos grasos durante periodos de ayuno (Franckhauser *et al.*, 2002).

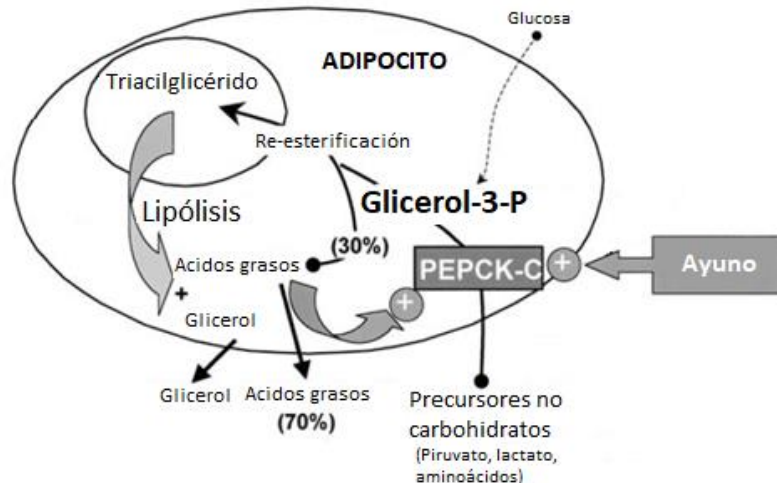


Figura 11. Gliceroneogénesis en adipocito regulada por la enzima PEPCK. Durante el ayuno, cerca del 30% de los ácidos grasos obtenidos de la lipólisis son re-esterificados a triacilglicéridos. Para llevar a cabo la re-esterificación, se requiere la formación de glicerol-3-fosfato (G3P) mediada por PEPCK y a partir de precursores no carbohidratos como el piruvato, lactato o ciertos aminoácidos (Adaptado de Forest *et al.*, 2003).

En ayuno, se produce la lipólisis y cierta cantidad de ácidos grasos libres se re-esterifican para generar triacilglicéridos en el tejido adiposo blanco. Dado que la glucosa está limitada, la capacidad de generar glicerol-3-fosfato (G3P) a partir de glucosa se ve limitada. Se ha demostrado que los precursores gluconeogénicos pueden convertirse en esqueletos de glicerol para la síntesis de triacilglicéridos por la acción de PEPCK (Millward *et al.*, 2010).

Se ha observado que la sobre expresión de PEPCK conlleva al desarrollo de obesidad sin presentar resistencia a la insulina asociada en ratones. El incremento en la re-esterificación reduce la liberación de ácidos grasos no esterificados y aumenta el almacenamiento de triacilglicéridos en el adipocito (Rutkowski *et al.*, 2015).

Finalmente, la proteína desacoplante 1 o UCP1 (Uncoupling Protein 1) es una proteína que también está regulada por la acción de PPAR γ , sin embargo, está implicada en la utilización de energía y no en su

almacenamiento. Esta enzima se expresa principalmente en el tejido adiposo pardo, donde lleva a cabo la termogénesis adaptativa (Figura 12). Dentro de la mitocondria aumenta la conductividad de la membrana interna para generar calor en lugar de ATP (Fedorenko et al., 2012).

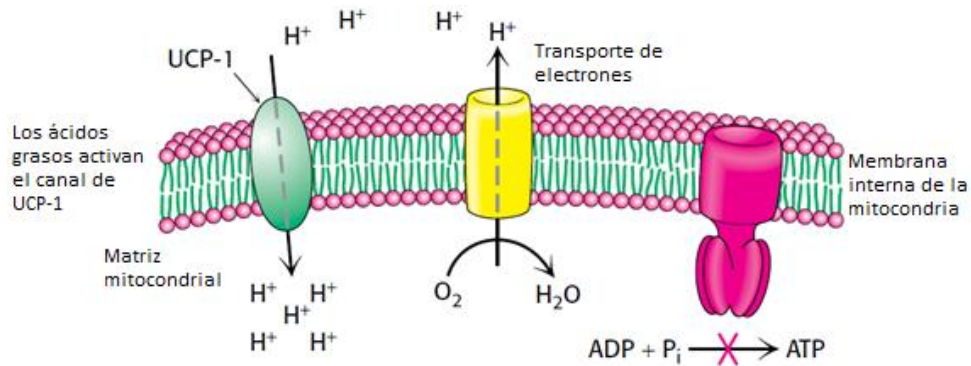


Figura 12. La proteína desacoplante genera calor permitiendo el flujo de protones hacia el interior de la mitocondria sin la síntesis de ATP (Adaptado de Berg et al., 2015).

Estudios recientes han demostrado que el tejido adiposo blanco puede pasar por un proceso de "pardeamiento". Bajo ciertos estímulos específicos, los adipocitos blancos cambian de fenotipo de adipocitos blancos a fenotipo similar a adipocitos pardos. Estos cambios se observan en morfología, patrón de expresión de genes y actividad mitocondrial (Park *et al.*, 2014). Los adipocitos que pasan por este proceso se conocen como adipocitos beige. Las principales características son la formación de pequeñas vacuolas lipídicas en lugar de una sola y la expresión de UCP1 dentro del tejido adiposo blanco (Kajimura *et al.*, 2015).

1.3 Estrategias de tratamiento de la obesidad

El continuo incremento en las prevalencias tanto de obesidad como de sobrepeso, han generado una mayor atención de la comunidad médica y de investigación con la finalidad de desarrollar estrategias de tratamiento eficaces y seguras.

Las estrategias actuales para el tratamiento de la obesidad se clasifican en tres grupos (Figura 13), dependiendo de la eficacia que se desea obtener con respecto a la reducción de masa grasa.

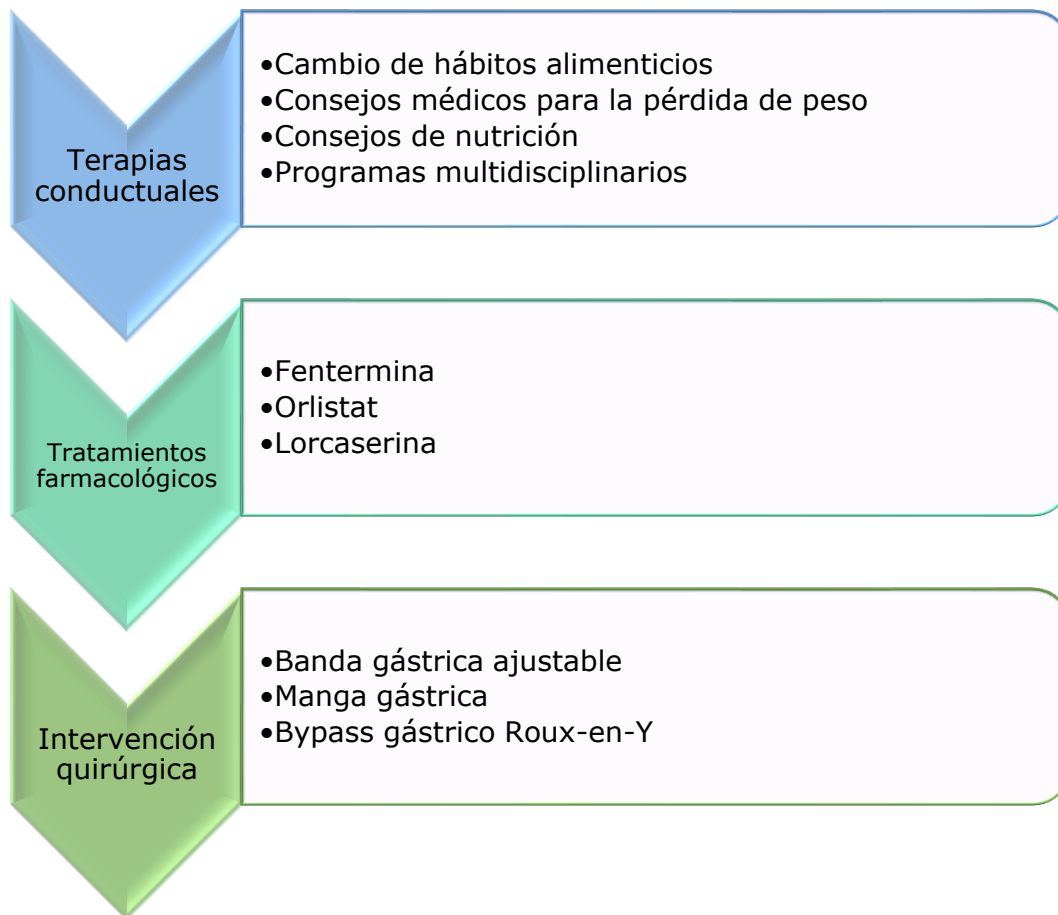


Figura 13. Principales tratamientos para la obesidad (Adaptado de Kushner, 2014).

Los principales criterios para la elección del tratamiento adecuado para cada paciente comprenden el IMC, la presencia de comorbilidades y en el caso de la intervención quirúrgica, la eficacia de los tratamientos previos (Wirth *et al.*, 2014)

Sin embargo, el éxito de la estrategia conductual depende en gran medida de la adherencia al tratamiento y muchas veces la pérdida de peso a largo plazo no se mantiene. Y tanto el tratamiento farmacológico como el tratamiento quirúrgico conllevan riesgos a la salud debido a efectos adversos o complicaciones posteriores (Mann *et al.*, 2007). Una alternativa a las estrategias de tratamiento de la obesidad y control del peso es el tratamiento nutricional, debido al bajo riesgo que presenta y la aplicación conjunta con los programas básicos de reducción de peso. Así mismo, se logra mejorar la salud cardiovascular y reducir la incidencia de enfermedades asociadas al síndrome metabólico. Se ha propuesto que la sustitución de ácidos grasos saturados por ácidos grasos mono o poliinsaturados puede tener efectos benéficos sobre el metabolismo.

En diversos estudios se ha demostrado que el consumo de ácidos grasos mono o poliinsaturados disminuye los niveles de colesterol, lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein, LDL) e insulina en suero, en comparación con ácidos grasos saturados. También se ha observado una relación positiva entre el consumo de ácidos grasos mono o poliinsaturados y mayor sensibilidad a la insulina (Schwab *et al.*, 2014).

1.4 Ácido graso *trans*-palmitoleico

Uno de los compuestos que ha llamado la atención como estrategia de prevención y tratamiento de obesidad y comorbilidades es el ácido graso *trans*-palmitoleico (TP). El TP es un ácido de cadena larga que presenta una insaturación en conformación *trans* entre el carbono 9 y 10 (T16:1n-7). Es un lípido bioactivo que se obtiene de la dieta a partir de leche y derivados lácteos y de la nuez de macadamia (Hirahatake *et al.*, 2014; Aquino-Bolaños *et al.*, 2017).

La evidencia epidemiológica respalda un papel positivo de las dietas ricas en lácteos y la salud cardio metabólica. De forma congruente y en modelos murinos de obesidad se ha mostrado que el consumo de lácteos puede reducir la adiposidad, mejorar la sensibilidad a la insulina y/o atenuar los marcadores de inflamación o estrés oxidante (Hirahatake *et al.*, 2014).

En un estudio reciente que involucró 21 países de los cinco continentes, se observó que el riesgo de presentar accidente cerebrovascular era considerablemente menor cuando el consumo de productos lácteos era mayor (Dehghan *et al.*, 2018). Estos resultados respaldan que es posible, entonces, que uno de los componentes de los lácteos que genere beneficios, sea el TP, el cual se encuentra en la fracción lipídica de los lácteos.

En estudios observacionales se ha demostrado que las mayores concentraciones de TP en circulación se asocian con una ligera disminución del Índice de Masa Corporal (IMC) y en la circunferencia de cintura. Así mismo, las altas concentraciones de este lípido bioactivo están asociadas con un ligero aumento en los niveles de lipoproteína de alta densidad (High Density Lipoprotein, HDL), disminución de triacilglicéridos y disminución en la proteína C reactiva, la cual es uno de los marcadores

de inflamación sistémica en pacientes con obesidad. Esto posiblemente se deba al efecto del ácido graso TP sobre la disminución de la síntesis de ácidos grasos en el hígado. Como consecuencia, ello pudiera promover aumento en la sensibilidad a la insulina (Mozaffarian *et al.*, 2010; Esser *et. al*, 2014). En dicho estudio también se reportó una reducción del 28% en el riesgo de desarrollo de DMT2, correlacionado al aumento en la concentración de TP circulante.

Mozaffarian y colaboradores en 2013 realizaron un estudio para determinar si el TP, como biomarcador del consumo de lácteos y derivados, presentaba asociación con menor incidencia de diabetes en un estudio multi-étnico. Para lo cual incluyendo variantes raciales (anglosajones, afroamericanos, hispanos, orientales), étnicas y en la dieta. En este estudio se observó que a mayores concentraciones de TP circulante se asocian menores concentraciones de triacilglicéridos y de insulina y menor presión sanguínea. En un análisis prospectivo, el aumento en la concentración de TP circulante se asoció a un 32% de reducción en el riesgo de padecimiento de DMT2. Todas estas relaciones fueron similares entre hombres y mujeres, y entre los diferentes grupos étnicos.

Así mismo, en otro estudio poblacional se observó correlación positiva significativa entre la pérdida de peso total y el porcentaje de TP en los triacilglicéridos del tejido adiposo basales, lo cual sugiere que los niveles de ácido palmitoleico reflejan la lipogénesis endógena (Kunešová *et al.*, 2012).

Finalmente, en un estudio realizado en el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes del Hospital Infantil de México, se encontró que existe relación entre la ingesta de TP y la

reducción en el área de adipocitos (Figura 14) en ratones alimentados con dieta alta en lípidos adicionada con TP.

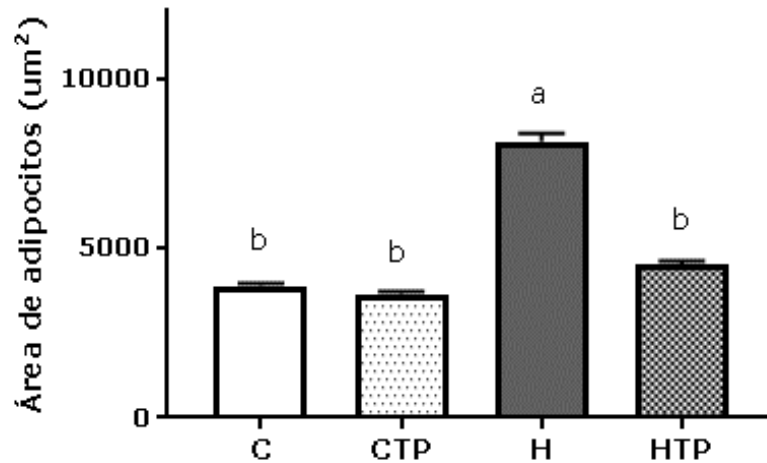


Figura 14. Efecto del TP en el tejido adiposo epididimal (TAE) de ratones alimentados con cuatro dietas diferentes con y sin la adición de TP (C: Control; CTP: Control con TP; H: Alta en lípidos; HTP: Alta en lípidos con TP). Disminución del área celular de adipocitos del TAE en los ratones alimentados con HTP, en comparación con H. ($a > b$, $p < 0.01$) (Datos por publicar).

Por estas razones, en el presente trabajo se evalúa el efecto asociado al consumo de TP, a nivel fisiológico y elucidar las posibles modificaciones moleculares que describan las posibles funciones que desempeña el TP en el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mediante la aplicación de las estrategias actuales de tratamiento y prevención de la obesidad no ha sido posible reducir los índices de este padecimiento, por lo que la investigación en nuevas estrategias que permitan utilizar herramientas nutricias que mejoren el perfil metabólico de pacientes con obesidad y comorbilidades es de gran importancia. El efecto del TP al ser adicionado a la dieta pudiera contribuir a la reducción de la adiposidad y mejorar el metabolismo en el tejido adiposo. En un futuro, el conocimiento sobre el efecto del TP aquí generado, podría favorecer la adiposidad y el perfil metabólico del tejido adiposo y, en consecuencia, mejorar la homeostasis energética sistémica.

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento constante en los índices de obesidad en la población mexicana se ha convertido en un problema de salud pública debido a la asociación y aumento en la incidencia de síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Aunado a la baja efectividad de las terapias actuales o el riesgo que representan, es de gran importancia establecer nuevas estrategias que permitan prevenir o reducir el aumento en la adiposidad.

Se ha establecido cierta relación entre las concentraciones circulantes de TP y la reducción del IMC y mejoras en el perfil lipídico de pacientes que adquieren este lípido a partir de la dieta. El presente trabajo busca establecer el efecto benéfico de este lípido bioactivo, reduciendo la adiposidad mediante modificaciones transcripcionales de genes asociados al metabolismo de lípidos.

4. HIPÓTESIS

El ácido graso *trans*-palmitoleico reducirá la adiposidad y modificará el metabolismo de glucosa y de lípidos, estimulando la lipólisis y reduciendo la lipogénesis, al ser administrado a un modelo murino de obesidad inducido por dieta alta en lípidos.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ácido *trans*-palmitoleico sobre la adiposidad y el metabolismo de glucosa, así como la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos en el tejido adiposo blanco de un modelo murino de obesidad inducida por dieta.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del ácido *trans*-palmitoleico sobre el desarrollo de obesidad y adiposidad en un modelo murino de obesidad inducida por dieta.
- Determinar el efecto del ácido *trans*-palmitoleico sobre la tolerancia a la glucosa y a la insulina en ratones con obesidad inducida por dieta.
- Evaluar la influencia del ácido *trans*-palmitoleico sobre la expresión de genes asociados a vías metabólicas de lípidos en el tejido adiposo blanco de los ratones con obesidad inducida por dieta.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

En la Figura 15 se presenta el diagrama de diseño experimental realizado en este trabajo

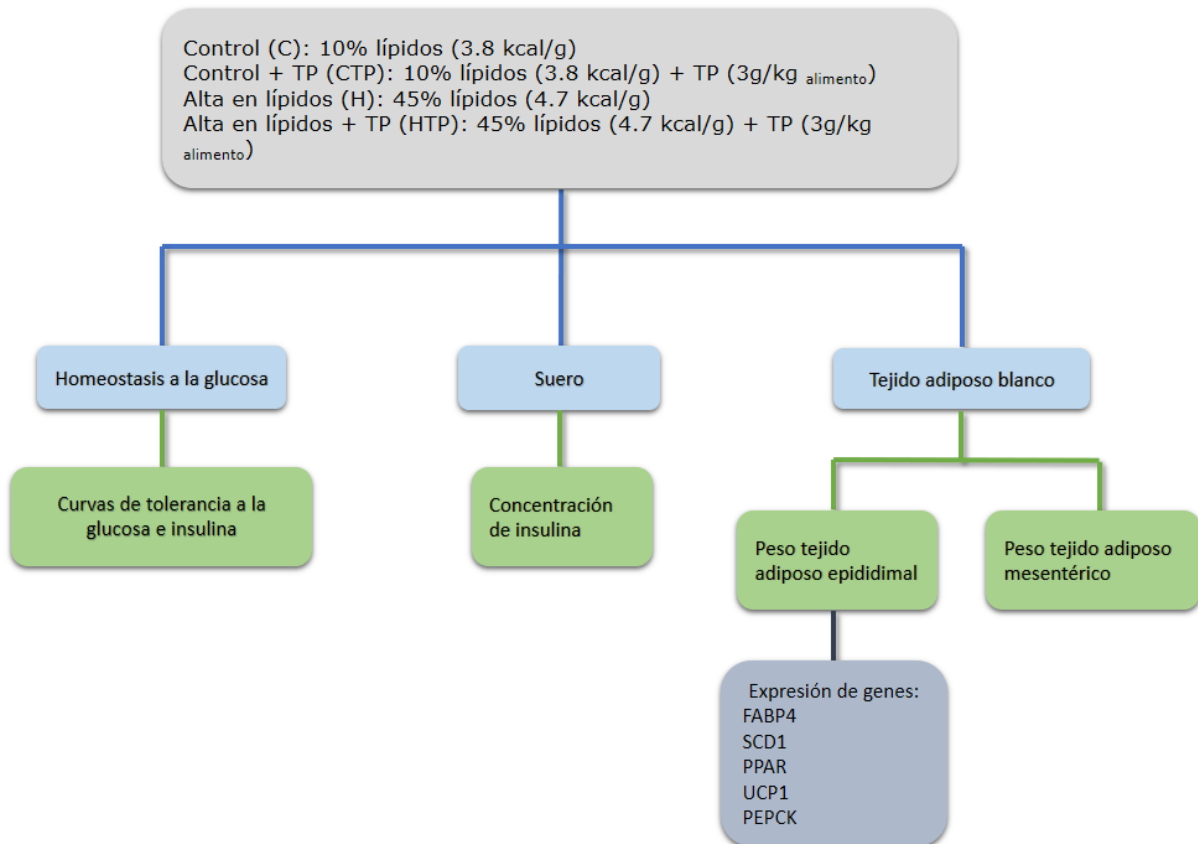


Figura 15. Diagrama de diseño experimental.

6.1 Experimentación en modelo *in vivo*

Se evaluó el efecto del ácido graso *trans*-palmitoleico en un modelo murino con tendencia a desarrollo de obesidad, mediante la administración de cuatro dietas experimentales. Las dietas control presentan un 10% de aporte energético por lípidos y las dietas altas en contenido de lípidos un 45% de aporte por lípidos, con y sin la adición de ácido *trans*-palmitoleico (3 g/kg alimento) (dietas control: C y CTP; dietas altas en lípidos: H y HTP).

Los ratones de la cepa C57BL/6 (con ocho semanas de vida) se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEA) de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), plantel Xochimilco. Se mantuvieron en el bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez con temperatura regulada, ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con acceso libre a alimento y agua. Se determinó el consumo de energía y el peso corporal de cada animal durante once semanas.

Consideraciones éticas: El protocolo de trabajo con modelo *in vivo* fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Infantil de México con el código de protocolo HIM 2016/079/SSA1359.

6.2 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina

Durante el periodo de adaptación y a partir de la semana nueve del periodo de alimentación con dietas experimentales se evaluó el metabolismo de la glucosa en los ratones mediante curvas de tolerancia a la glucosa oral (oGTT, por sus siglas en inglés, oral Glucose Tolerance Test) e intraperitoneal (ipGTT o intraperitoneal Glucose Tolerance Test) y curva de tolerancia a la insulina (ITT, Insulin Tolerance Test).

Para la realización de los oGTT y los ipGTT iniciales y finales, los animales se mantuvieron con un ayuno de 4 h y posteriormente administrados con glucosa (1.5 g/kg de peso corporal). Se determinó la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) mediante glucómetros Accu-Chek® Performa a los 0, 5, 15, 30, 45, 60 y 120 min posteriores a la administración. Adicional a la determinación de glucosa en sangre, en estos experimentos se obtuvieron muestras de sangre a los 0, 5 y 15 min posteriores a la administración, con la finalidad obtener suero y evaluar la concentración de insulina. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C y conservadas a -80°C hasta el momento de su análisis.

Para la realización de los ITT inicial y final, los animales se mantuvieron 4 h en ayuno y posteriormente fueron administrados con insulina (1 U/kg de peso corporal, i.p.). Se determinó la concentración de glucosa en sangre (mg/dL) mediante glucómetros Accu-Chek® Performa a los 0, 15, 30, 45 y 60 min posteriores a la administración.

6.3 Determinación de insulina en suero

De las muestras de sangre que se obtuvieron en el ipGTT final, se determinó la concentración circulante de insulina con estuches comerciales ALPCO® Mouse Insulin que consiste en un ensayo ELISA.

6.4 Determinación de la composición corporal y obtención de tejidos

Al finalizar las once semanas de alimentación se llevó a cabo el procedimiento de eutanasia. Se obtuvo el valor estimado de la masa grasa mediante el equipo Impedivet®. Se obtuvieron los tejidos adiposos epididimal (TAE) y mesentérico (TAM) para determinar el peso de cada

uno. Al ser removidos se congelaron de forma rápida sumergiéndolos en N₂ líquido (-196°C).

6.5 Extracción y evaluación de integridad de RNA

A partir del tejido adiposo epididimal obtenido de los ratones en el proceso de eutanasia, se extrajo RNA total mediante TRIzol® y columnas de estuche comercial RNeasy Mini kit (Qiagen®). El tejido adiposo se lisó mediante proceso mecánico (sonicación) y se centrifugó para obtener la fase orgánica (TRIzol®). La purificación se llevó a cabo en las columnas Qiagen®.

El RNA purificado se solubilizó en agua y se determinó la concentración, la pureza mediante la relación 260/280 nm y la integridad. La concentración y la relación 260/280 nm del RNA extraído se determinaron mediante espectroscopía utilizando el equipo Multiskan Go (Thermo Scientific®).

La integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó gel de agarosa al 1% m/v con bromuro de etidio como agente intercalante. La electroforesis se realizó en cámara horizontal (Thermo Scientific®) a 90 V durante 60 min. El gel se reveló bajo luz UV en foto documentador Fusion X (Vilber Lourmat®).

6.6 Evaluación de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos

A partir de las disoluciones de RNA obtenidos del tejido adiposo epididimal se realizó la síntesis de DNA complementario o cDNA. Utilizando el paquete comercial SCRIPT cDNA Synthesis kit (Jena

Bioscience®) se realizó la transcripción reversa en termociclador MaxyGene II (Axygen®) bajo las condiciones:

- Incubación: 42°C/10 min
50°C/60 min
- Inactivación retro transcriptasa: 70°C/10 min
- Finalización: 4°C/∞

Con los cDNAs obtenidos se evaluó la expresión relativa de los genes mediante qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction). Se evaluaron los genes que codifican para las proteínas PPAR γ , SCD1, PEPCCK, UCP1, FABP4 y L32, como gen constitutivo.

Las condiciones del termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies®) fueron:

- Incubación: 50°C/2 min
- Activación de polimerasa: 95°C/10 min
- Amplificación: 40 ciclos
 - o 95°C/15 s
 - o 60°C/1 min

6.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. Los parámetros de peso corporal, consumo de energía y las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina fueron tratados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Los parámetros de concentración de insulina, composición corporal y expresión de genes fueron tratados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los ANOVA se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 7®. Se realizaron pruebas de Tukey para la comparación entre grupos. Los valores de p considerados significativos son 0.01, 0.05 y 0.0001.

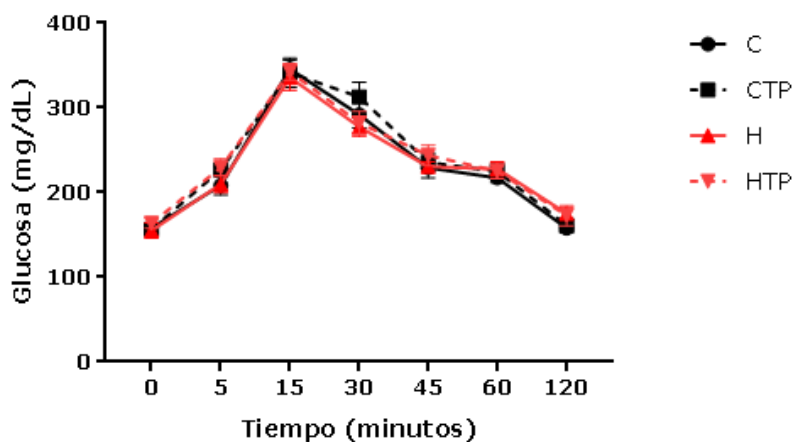
7. RESULTADOS

Una vez ingresados los animales al bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez, fueron colocados en cajas individuales con ventilación controlada, consumiendo dieta de adaptación (*chow*) por una semana.

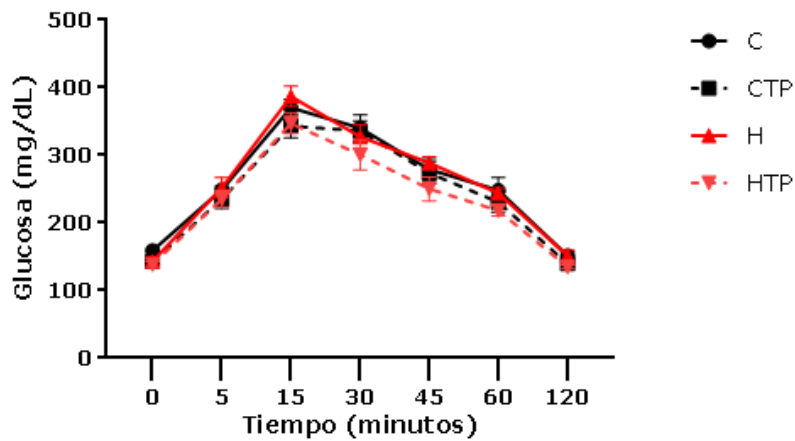
Durante este periodo se realizaron las curvas iniciales de tolerancias a la glucosa y a la insulina (oGTT, ipGTT, ITT, por sus siglas en inglés) para establecer el estado metabólico de los ratones antes del consumo de las dietas experimentales.

7.1 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina iniciales

Tanto en el oGTT (Gráfica 1) como en el ipGTT (Gráfica 2), no se observó diferencia significativa entre los grupos de trabajo con respecto al metabolismo de glucosa. En estas curvas se observa que, al inicio del experimento y antes del consumo de TP, los ratones de los cuatro grupos de trabajo presentaron la misma respuesta metabólica al estímulo de la glucosa, independientemente de la vía de administración.

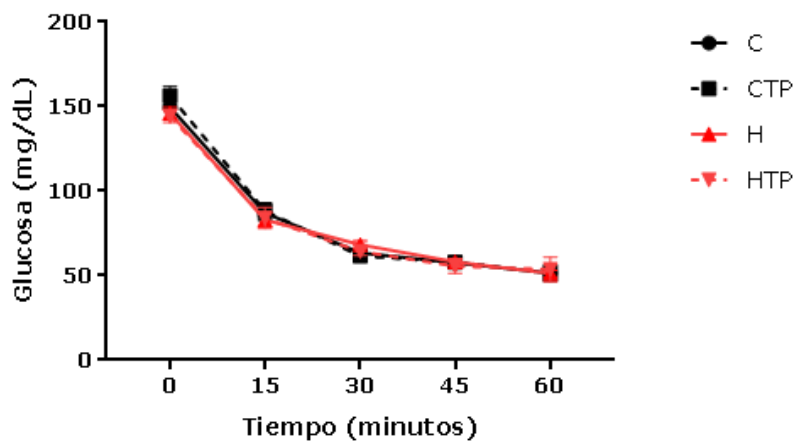


Gráfica 1. Prueba de tolerancia a la glucosa vía oral de los cuatro grupos de dietas experimentales (n = 8 - 10). Valores expresados como promedio \pm SEM.



Gráfica 2. Prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal de los cuatro grupos de dietas experimentales (n = 8 - 10). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Mediante el ITT es experimentalmente posible determinar si existe resistencia al efecto de la insulina. En los resultados se observó que los ratones no presentaron resistencia al efecto de la hormona (Gráfica 3) ya que la disminución de la glucosa en los cuatro grupos de trabajo tuvo el mismo comportamiento.



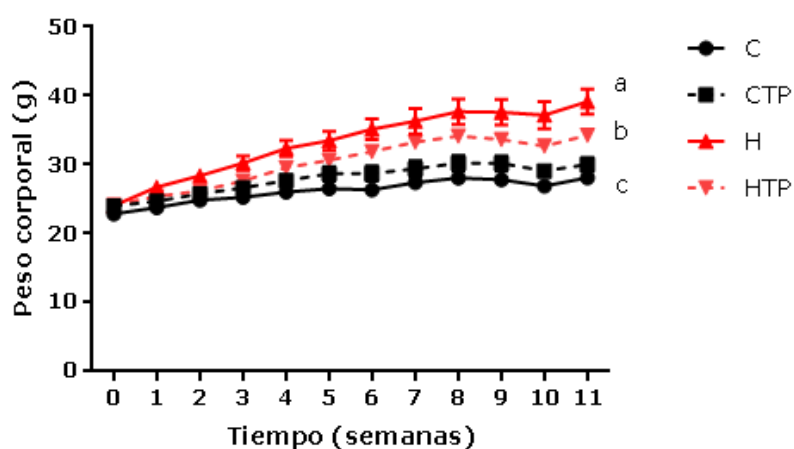
Gráfica 3. Prueba de tolerancia a la insulina vía intraperitoneal de los cuatro grupos de dietas experimentales (n = 7 - 10). Valores expresados como promedio \pm SEM.

En conjunto, estos experimentos permiten establecer que metabólicamente todos los animales se encontraron bajo las mismas condiciones de respuesta antes de iniciar el tratamiento con las dietas experimentales.

7.2 Tratamiento con dietas experimentales

Durante las once semanas de alimentación se registró el aumento de peso corporal y se determinó el consumo de energía para cada grupo de acuerdo con las especificaciones de aporte energético por gramo de alimento (kcal/g) de las dietas.

En el aumento de peso corporal de los ratones (Gráfica 4) se observó que a partir de la semana tres los grupos con alto contenido de lípidos (H y HTP) comenzaron a aumentar de peso en mayor medida al comparar con los grupos control (C y CTP) y este comportamiento se mantuvo hasta la semana ocho.

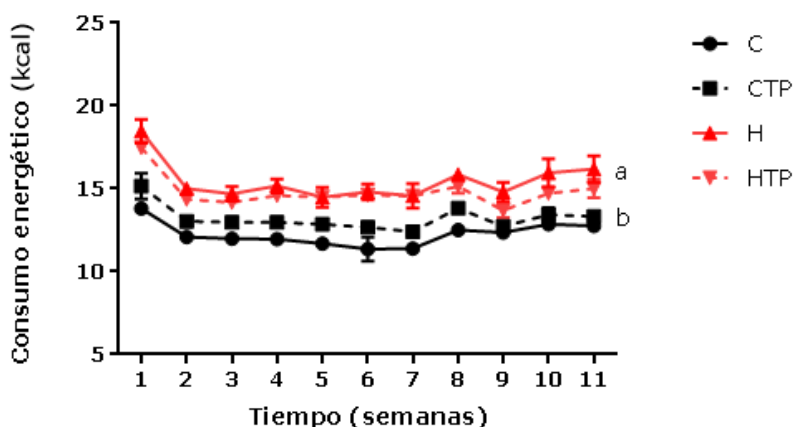


Gráfica 4. Aumento de peso corporal (g) durante el periodo de alimentación con dietas experimentales (De la semana 3 a la semana 7: $a > c$, $p < 0.001$; de la semana 8 a la semana 11: $a > b > c$, $p < 0.05$) ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

A partir de la semana 8 y hasta el final del periodo de alimentación, el grupo HTP aminoró el incremento de peso corporal en comparación con el grupo H. Los grupos control no presentaron diferencia estadísticamente significativa durante todo el periodo de alimentación por lo que la adición del TP en una dieta con 10% de lípidos no ejerce efectos significativos.

Sin embargo, en la dieta con alto contenido de lípidos, el TP logró revertir el incremento de peso, por lo cual se observa que sí hay un efecto benéfico por la adición de este nutrimento.

Con respecto al consumo de energía (Gráfica 5), se observó que desde la semana uno y hasta la semana once se estableció diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y los grupos con alto contenido de lípidos.



Gráfica 5. Ingesta energética (kcal) promedio por día durante las once semanas de alimentación de los cuatro grupos de trabajo (a > b, $p < 0.0001$) ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

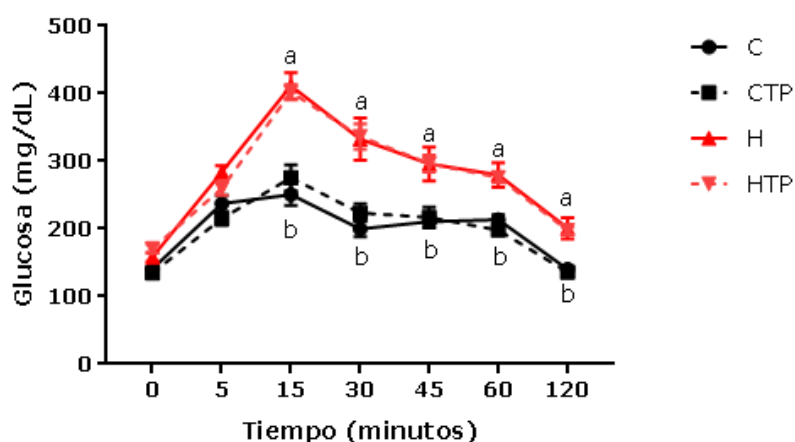
No hubo diferencias significativas entre las dietas control (C vs. CTP) o entre las dietas altas en lípidos (H vs HTP).

En cuanto al aumento de peso, se debe considerar que tanto el grupo H como el HTP mantuvieron un consumo de energía similar durante

todo el periodo de alimentación como se muestra previamente (Gráfica 5). De esta manera, el efecto del TP sobre el incremento de peso pudiera verse reflejado en el metabolismo de la glucosa, por lo cual se procedió a medir la tolerancia a la glucosa e insulina.

7.3 Pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina finales

Con la finalidad de evaluar el estado metabólico de los ratones y el efecto que presentó el consumo de las dietas experimentales, se realizaron nuevamente las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina (oGTT, ipGTT, ITT) a partir de la semana nueve de alimentación y previo al procedimiento de eutanasia (semana once).

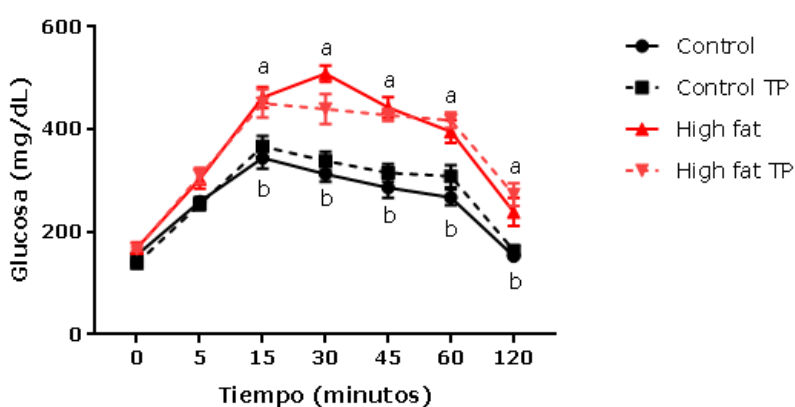


Gráfica 6. Prueba de tolerancia a la glucosa vía oral de los cuatro grupos después de la alimentación con dietas experimentales ($a > b$, $p < 0.05$) ($n = 9 - 11$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Debido a la alimentación con las dietas experimentales, se observó un comportamiento diferente tanto en el oGTT (Gráfica 6) como en el ipGTT (Gráfica 7) en los grupos H y HTP con respecto a los grupos C y CTP. En cuanto al ipGTT, se observa una ligera tendencia a restablecer la

concentración de glucosa en sangre en el grupo HTP a los 30 min, sin embargo, en los tiempos posteriores el comportamiento se mantiene similar al grupo H.

Con estos resultados se considera que el estado de obesidad que se indujo en los grupos con alto contenido de lípidos afectó el metabolismo de la glucosa ocasionando un efecto de intolerancia a la glucosa en estos ratones.



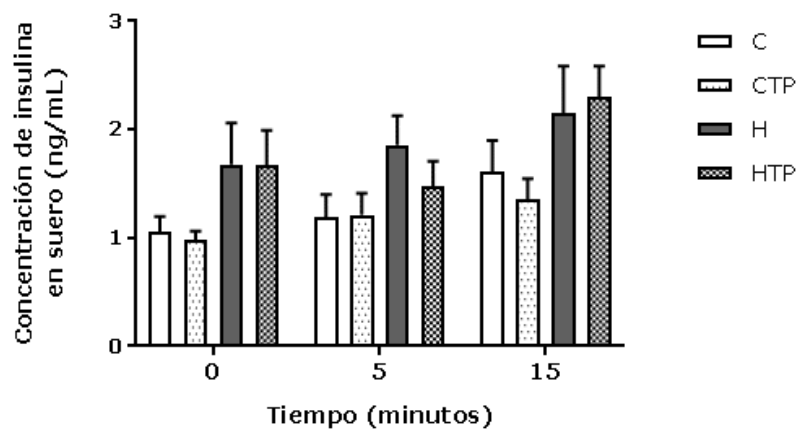
Gráfica 7. Prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal de los cuatro grupos después de la alimentación con dietas experimentales ($a > b, p < 0.05$) ($n = 6 - 11$).

Valores expresados como promedio \pm SEM.

Para corroborar los comportamientos observados en el ipGTT final con respecto a la respuesta a la administración de glucosa, se determinó la concentración de insulina en suero mediante un ensayo ELISA (Gráfica 8).

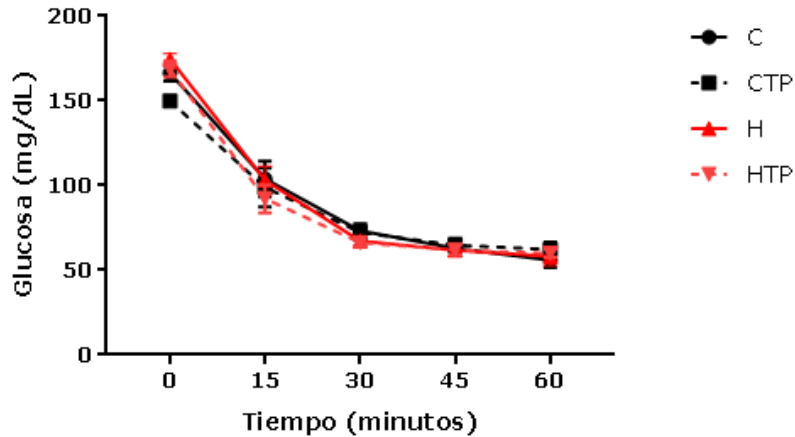
En la determinación de la concentración de insulina en suero no se estableció diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, se observa un ligero incremento en la concentración de insulina basal entre los grupos control y los grupos con alto contenido de lípidos.

Este resultado, junto con los resultados del ipGTT (Gráfica 7) sugieren que los ratones de los grupos H y HTP no sólo presentaron intolerancia a la glucosa, sino que también tendencia al aumento en la secreción de insulina debido al estímulo de glucosa.



Gráfica 8. Concentración sérica de insulina (ng/mL) estimulada por la administración de glucosa vía intraperitoneal a los 0, 5 y 15 min posteriores a la administración (n = 8 - 11). Valores expresados como promedio ± SEM.

Con respecto al ITT que se realizó en la etapa final de la alimentación (Gráfica 9) se puede observar que no se presentaron diferencias significativas en el comportamiento de los cuatro grupos de trabajo.



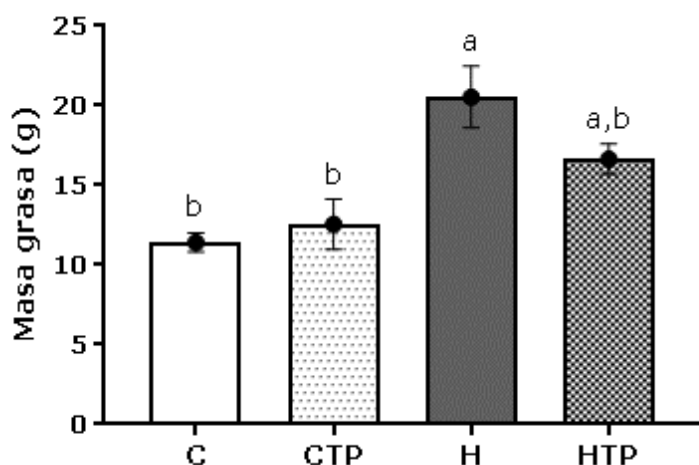
Gráfica 9. Prueba de tolerancia a la insulina vía intraperitoneal de los cuatro grupos después de la alimentación con dietas experimentales (n = 6 - 10). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Este comportamiento demuestra que el TP no favorece la mejora en el metabolismo de la glucosa y posiblemente este ácido graso pueda estar solamente involucrado en el metabolismo de lípidos para ejercer sus efectos benéficos.

7.4 Determinación de la composición corporal

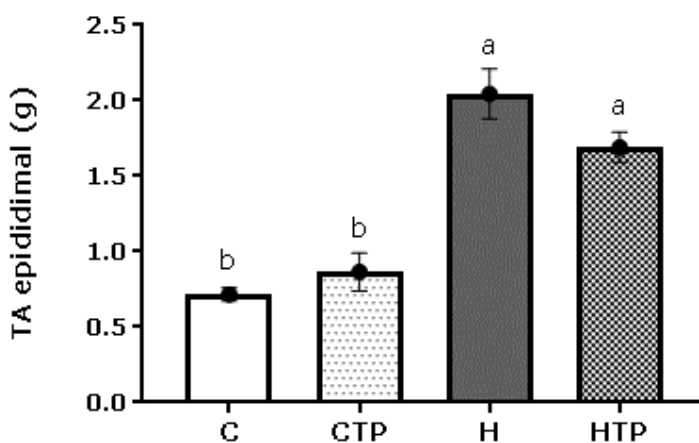
Al finalizar el periodo de alimentación se realizó el procedimiento de eutanasia. Durante este procedimiento se determinó la masa grasa y se recuperaron tejidos adiposos epididimal (TAE) y mesentérico (TAM), de los cuales se determinó el peso (g).

En cuanto a la masa grasa (Gráfica 10) se observa diferencia significativa entre los grupos C y CTP con el grupo H, sin embargo, el grupo HTP no presentó diferencia estadística significativa, pero si cierta tendencia a ser menor que el grupo H.



Gráfica 10. Masa grasa (g) determinado *post mortem* ($a > b$, $p < 0.01$) ($n = 7 - 9$).
Valores expresados como promedio \pm SEM.

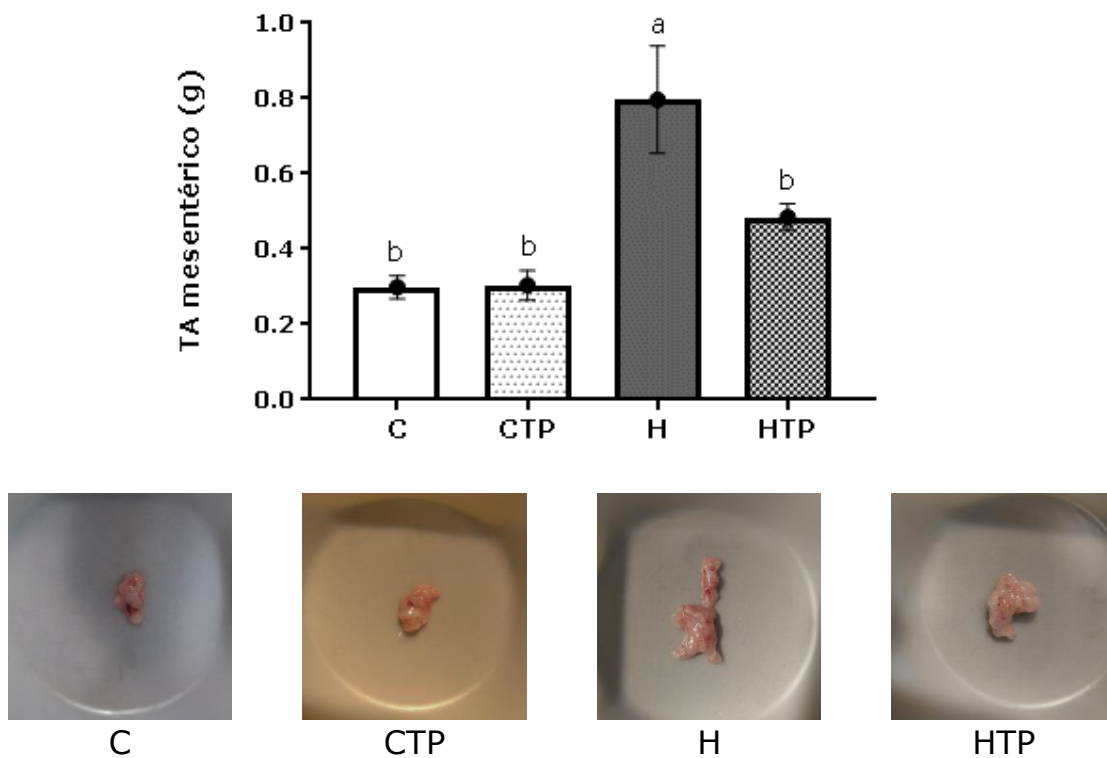
En los resultados obtenidos con respecto al peso de TAE se observó cierta tendencia a ser menor en el grupo HTP en comparación con el grupo H, sin embargo, no existe diferencia significativa (Gráfica 11). Se determinó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y los grupos con alto contenido de lípidos.



Gráfica 11. Peso (g) del TAE obtenido *post mortem* ($a > b$, $p < 0.0001$) ($n = 8 - 9$).
Valores expresados como promedio \pm SEM.

En resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, se observó diferencia significativa en el peso de TAE entre los grupos H y HTP, sin embargo, en el presente trabajo sólo se puede observar cierta tendencia, pero no está respaldada por el análisis estadístico.

De forma interesante, en cuanto al TAM (Gráfica 12) sí se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos H y HTP, es decir que los ratones que fueron alimentados con la dieta alta en lípidos y adición de TP tuvieron un menor crecimiento de la masa de TAM y estadísticamente fue similar a los grupos controles.



Gráfica 12. Peso (g) del TAM obtenido *post mortem* ($a > b$, $p < 0.05$) ($n \geq 8$) ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

7.5 Extracción y evaluación de integridad de RNA

Una vez que se obtuvieron las disoluciones de RNA del tejido adiposo epididimal, se determinó concentración, pureza e integridad de las muestras trabajadas.

Las concentraciones de RNA determinadas se encontraron entre los 240 y hasta cerca de 700 ng/ μ L. Los valores obtenidos de la relación 260/280 nm, que expresan la pureza del RNA, fueron entre 1.9 y 2.1. Estos valores son aceptados y se consideran como RNA "puro".

Previo a la síntesis del DNA complementario, la integridad del RNA fue validada mediante gel de agarosa al 1% m/v (Figura 16). En el revelado del gel se observaron dos bandas correspondientes a las fracciones de RNA ribosomal 18S y 28S.

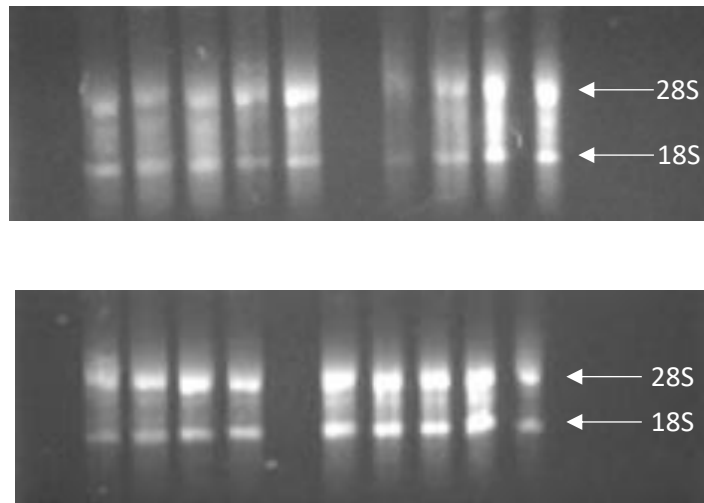
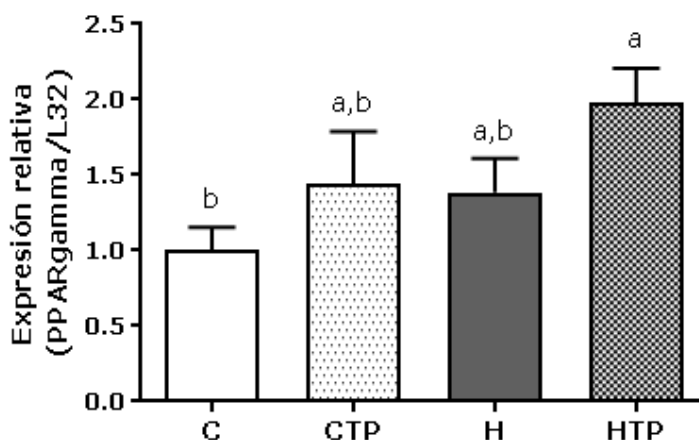


Figura 16. Evaluación de la integridad de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Señal asociada a las bandas de RNA ribosomal de las fracciones 28S y 18S que permiten determinar que la integridad del RNA total permite el análisis de RNA mensajeros (mRNA) presentes en las muestras.

7.6 Evaluación de la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos

Una vez sintetizado el cDNA, se realizaron las PCR cuantitativas (qPCR) para determinar la expresión relativa de genes asociados al metabolismo de lípidos. Para todos los genes evaluados se utilizó L32 como gen endógeno.

Con base en la reducción del peso del tejido adiposo y la reducción en el área de adipocitos, se evaluó la expresión relativa del factor de transcripción PPAR γ (Gráfica 13), involucrado en la adipogénesis y metabolismo del tejido adiposo.



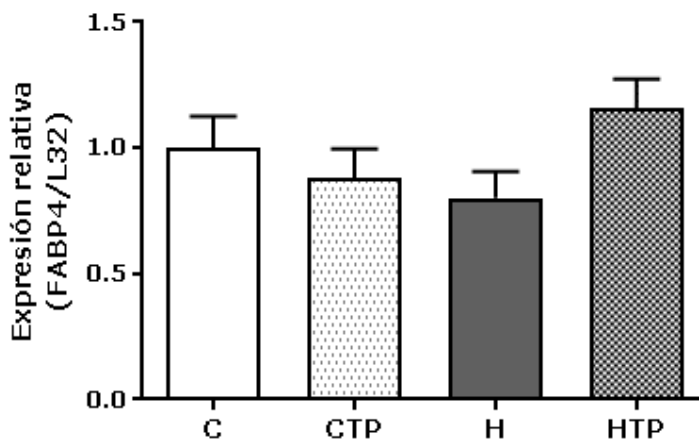
Gráfica 15. Expresión relativa de PPAR γ en TAE de ratones alimentados con las dietas experimentales ($a > b$, $p < 0.05$) ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Se determinó diferencia significativa entre el grupo C y el grupo HTP. El grupo HTP no fue estadísticamente diferente a los grupos CTP y H. A pesar de esto, se observa tendencia de HTP a ser mayor que los otros grupos de alimentación.

Para determinar si se presentó modificación en la vía lipolítica que ocasionó la reducción del tejido adiposo, se evaluó la expresión relativa de la proteína FABP4 (Gráfica 16).

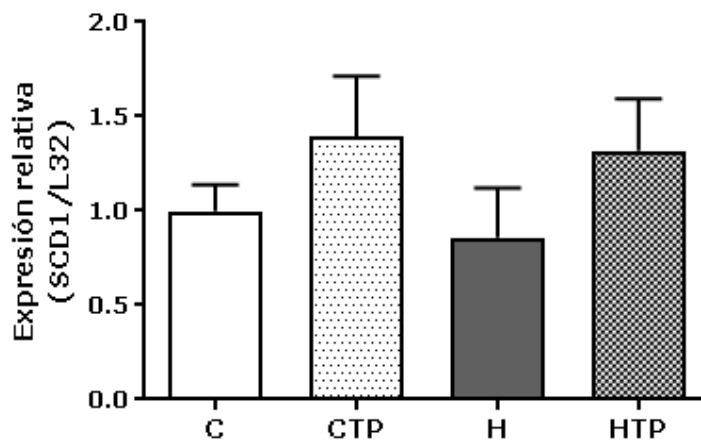
De acuerdo con el análisis estadístico, no hay diferencias significativas entre los cuatro grupos de alimentación, por lo que la movilización de ácidos grasos libres provenientes del TAE no fue modificada por la regulación transcripcional de esta proteína.

Posteriormente se evaluó posibles alteraciones en la vía lipogénica del tejido adiposo, determinando la expresión relativa de SCD1 (Gráfica 17) para establecer si la adición de TP tenía efecto regulatorio en la actividad de dicha enzima, y por lo tanto alteraba la lipogénesis.



Gráfica 16. Expresión relativa de FABP4 en TAE de ratones alimentados con las dietas experimentales (n = 8 - 9). Valores expresados como promedio \pm SEM.

No se estableció diferencia significativa entre los cuatro grupos de alimentación con respecto a la expresión de SCD1. Sin embargo, se observa tendencia a aumentar en las dietas adicionadas con TP (CTP y HTP) en comparación con las dietas sin este lípido bioactivo (C y H).

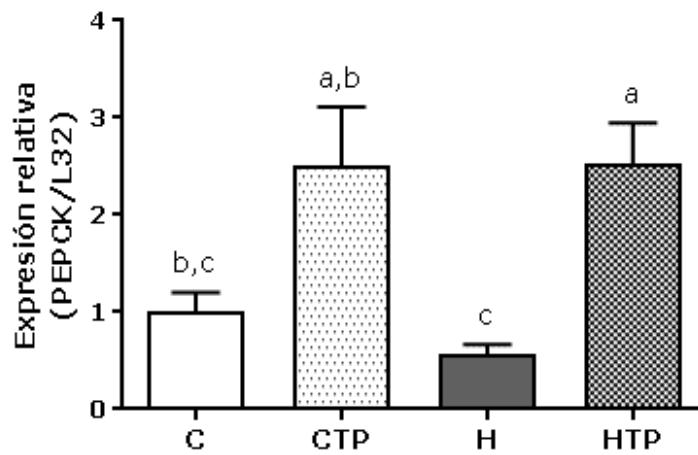


Gráfica 17. Expresión relativa de SCD1 en TAE de ratones alimentados con las dietas experimentales (n = 8 - 9). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Otra enzima de interés para evaluar la vía lipogénica en el tejido adiposo es PEPCCK. En los resultados obtenidos sobre la expresión relativas se determinó diferencia significativa entre los grupos de alimentación con las dietas HTP y H (Gráfica 18).

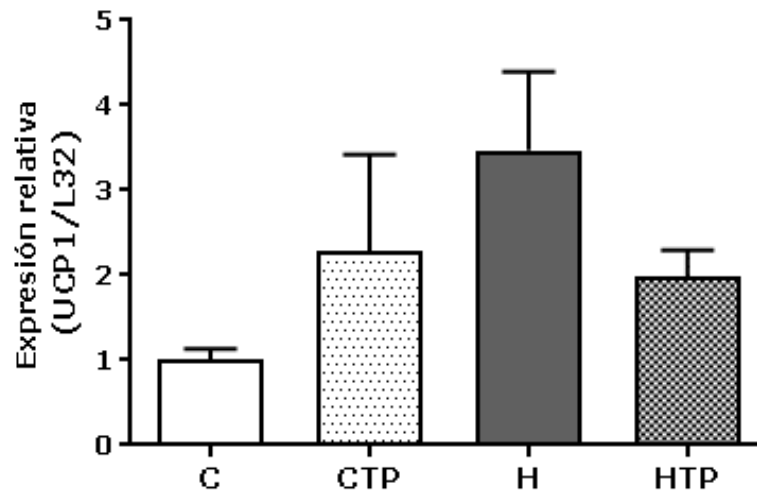
Este resultado establece que la síntesis de glicerol en el tejido adiposo requerido para la esterificación de ácidos grasos se encuentra aumentada y sugiere que la expansión del tejido adiposo en los ratones alimentados con la dieta HTP debería ser mayor que en los ratones alimentados con las otras dietas.

Finalmente, se determinó la expresión relativa de UCP1 para determinar la posible actividad de esta enzima en el tejido adiposo blanco. De ser así, esto implicaría la activación de la termogénesis adaptativa que lleva a la disminución en el peso del tejido adiposo blanco.



Gráfica 18. Expresión relativa de PEPCK en TAE de ratones alimentados con las dietas experimentales ($a > b > c$, $p < 0.05$) ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

Los resultados obtenidos (Gráfica 19) muestran que el consumo de TP no modificó la expresión de UCP1 en este modelo.



Gráfica 19. Expresión relativa de UCP1 en TAE de ratones alimentados con las dietas experimentales ($n = 8 - 9$). Valores expresados como promedio \pm SEM.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que la adiposidad y masa del tejido adiposo fue menor debido al consumo de TP, sin modificaciones en la homeostasis de la glucosa.

Como reflejo del cambio de adiposidad se evaluó la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, en donde únicamente se mostró diferencia en PEPCCK como enzima clave en el metabolismo del glicerol.

8. DISCUSIÓN

El aumento en los índices de obesidad y sobrepeso, junto con el desarrollo de comorbilidades como la DMT2, han generado un gran interés en la búsqueda de nuevas estrategias de prevención.

Los ácidos grasos obtenidos de la dieta son nutrimentos que actúan como una importante fuente de energía. Sin embargo, las funciones biológicas de éstos no se limitan a la función energética, ya que pueden presentar efectos benéficos para la salud (O'Connor & Rudkowska, 2018). Esto ha dirigido la atención a estudiar el efecto de diversos ácidos grasos y derivados. En este trabajo se evaluó el efecto del ácido graso TP, con la finalidad de dilucidar la relación entre su consumo y la reducción de la adiposidad, así como la expresión de moléculas clave para el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo.

Para poder establecer las condiciones metabólicas iniciales de los ratones se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina. Los resultados obtenidos permitieron determinar que la respuesta metabólica al estímulo de la glucosa o la insulina fue similar en los cuatro grupos de trabajo, lo que permite comprobar que las condiciones metabólicas de los ratones no presentaban alteraciones previo a la alimentación con las dietas experimentales. La diferencia observada con respecto a la vía de administración (oral contra intraperitoneal) consiste en la actividad de las incretinas, que son un grupo de hormonas peptídicas intestinales que se secretan después de la ingesta de nutrimentos y estimulan la secreción de insulina. En el caso de la vía intraperitoneal, estas hormonas no son secretadas debido a que no se estimula la ingesta por la vía oral y las incretinas no ejercen su efecto (Nauck & Meier, 2018).

Una vez establecida la respuesta metabólica de los ratones, se administraron las dietas experimentales. Conforme a estudios publicados,

entre el 20 y 60% de la energía aportada por lípidos es aceptado como dieta alta en lípidos (Buettner *et al.*, 2007). Por lo tanto, el 45% de lípidos de las dietas utilizadas es un aporte adecuado para favorecer el desarrollo de obesidad en roedores.

Se han establecido criterios para determinar si los ratones desarrollan estados de obesidad, comparando la diferencia porcentual de peso contra el grupo control de ratones de la misma edad. Cuando la diferencia en el peso corporal entre el grupo control y el grupo de alto contenido de lípidos se encuentra por arriba del 25%, se considera que los ratones han desarrollado obesidad (Levin & Dunn-Meynell, 2002; Woods *et al.*, 2003; Hariri & Thibault, 2010).

Con base en estos criterios y de acuerdo con los promedios de pesos corporales por grupo en la semana once, se determinó que la diferencia porcentual del grupo C con el grupo H fue de 39.27%. El grupo HTP presentó un 17.33% de diferencia en el aumento de peso en comparación con el grupo H.

De acuerdo con los resultados del consumo energético, se observa que los grupos con alto contenido de lípidos mantuvieron un consumo similar y en los grupos control se observó el mismo comportamiento. Por lo que el aumento de peso corporal se debe únicamente a la proporción de lípidos en cada una de las dietas. De esta forma, se puede asegurar que la diferencia de peso corporal observada entre las dietas alta en lípidos sugiere que la reducción en la adiposidad es debido al TP adicionado, ya que la formulación de ambas dietas es idéntica a excepción de la suplementación.

Al finalizar el periodo de alimentación se observó asociación entre el desarrollo de obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Mediante las curvas de tolerancia se observó el efecto de intolerancia a la

glucosa, sin embargo, a pesar del desarrollo de obesidad, no se indujo un efecto de resistencia a la insulina (mostrado en la prueba ITT) en los grupos con alto contenido de lípidos.

Con respecto a la concentración de insulina en suero de muestras obtenidas durante el ipGTT final, no se determinó diferencia significativa entre los grupos de trabajo. Sin embargo, se presenta una tendencia a mayor secreción de insulina en los grupos H y HTP, tanto en condiciones basales, como en la secreción estimulada por glucosa.

Existe relación entre el desarrollo de obesidad y alteraciones en el metabolismo de la glucosa y se ha reportado que los ratones C57BL/6 sometidos a alimentación con dieta alta en lípidos pueden presentar resistencia a la insulina asociada a disminución en la tolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia (Lichtenstein & Schwab, 2000; Burcelin *et al.*, 2001).

Con base en estos antecedentes, el comportamiento observado en este experimento se ajusta, ya que los ratones alimentados con las dietas H y HTP desarrollaron intolerancia a la glucosa. Aunque la determinación de insulina en suero no estableció diferencia significativa, es importante resaltar que el periodo de alimentación comenzó a inducir alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Es probable que, con un mayor tiempo de administración de las dietas experimentales, las alteraciones en el metabolismo de glucosa se agraven e incluso se presente el efecto de resistencia a la insulina.

Sin embargo, el comportamiento descrito contrasta con los resultados de estudios observacionales donde se estableció relación positiva entre los niveles de TP en suero con la mejora en los niveles de glucosa en ayunas y tolerancia a la glucosa (Da Silva *et al.*, 2014; Kratz *et al.*, 2014).

En este modelo de obesidad fue evidente la relación que existe entre las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la obesidad, de acuerdo con las curvas de tolerancia a la glucosa de los ratones obesos. Sin embargo, estos mismos resultados demuestran que el TP no ejerce ningún efecto benéfico sobre la homeostasis a la glucosa.

Al evaluar la masa grasa y el peso de los tejidos adiposos obtenidos durante el procedimiento de eutanasia, se observó que la adición del TP tiene efecto directo en la adiposidad de los ratones alimentados con la dieta HTP.

En los estudios publicados por Mozaffarian y col. (2010; 2013), se observaron relaciones positivas entre la concentración de TP circulante con la reducción del IMC y la circunferencia de cintura. En los resultados observados en este modelo, como en estos estudios clínicos, se observa un efecto del TP en la reducción de la adiposidad.

Con respecto al peso de los tejidos adiposos epididimal y mesentérico con los valores obtenidos de masa grasa se observa la misma tendencia, ya que ambos tejidos tuvieron un peso menor en el grupo HTP, equiparando a la tendencia de la masa grasa a ser menor en comparación con el grupo H. Estos comportamientos indican que el órgano blanco del TP es el tejido adiposo blanco, principalmente el TAM y posiblemente el TAE. Estos tejidos adiposos (epididimal y mesentérico) son viscerales y se ha establecido en diversos estudios poblacionales una relación entre el tejido adiposo visceral y la presencia de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad.

En un estudio con pacientes obesos (IMC de 35 kg/m²) se reportó una fuerte correlación entre el tejido adiposo visceral y la presencia de aterosclerosis aórtica. Sin embargo, estas asociaciones no se han observado únicamente en pacientes obesos. En pacientes no diabéticos

con IMC de 25 kg/m² se confirmó una alta correlación entre el tejido adiposo visceral y resistencia a la insulina (Oka *et al.*, 2012; Neeland *et al.*, 2014)

Con base en esto, la disminución en el tamaño de estos tejidos asociado al consumo de TP se vuelve relevante por la posibilidad de contrarrestar el desarrollo de este tipo de comorbilidades y favorecer las mejoras en el metabolismo de lípidos.

En los resultados de los estudios clínicos (Mozaffarian *et al.*, 2010; Mozaffarian *et al.*, 2013), se asoció la concentración circulante de TP con la disminución en la concentración de triacilglicéridos en suero.

De acuerdo con el comportamiento metabólico y los ciclos circadianos de los ratones, se sugiere que, para la evaluación del metabolismo de lípidos medidos en suero, el ayuno óptimo debe ser entre 12 y 14 h previo a la obtención de las muestras (Jensen *et al.*, 2013).

Sin embargo, durante los experimentos de evaluación del metabolismo de glucosa los tiempos de ayuno se mantuvieron en 4 h previo a la administración. Debido a esto, no fue viable observar la alteración en la concentración sérica de triacilglicéridos, colesterol o ácidos grasos libres, que permitieran establecer diferencias significativas y asociaciones del metabolismo de lípidos con las modificaciones en el metabolismo de la glucosa.

La exposición a un tiempo de ayuno más prolongado, que permita establecer el metabolismo de lípidos y las alteraciones séricas es una perspectiva en el desarrollo de este trabajo.

Para establecer relaciones entre el consumo de TP y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo, se realizó la evaluación de la expresión relativa de RNA mensajeros (mRNA).

El tejido adiposo participa en la homeostasis energética mediante dos principales vías metabólicas. La primera de estas vías responde a la ingesta de nutrimentos, mediante el almacenamiento de energía en forma de triacilglicéridos (lipogénesis). La segunda vía responde a la demanda metabólica de energía durante periodos de ayuno, liberando ácidos grasos y glicerol (lipólisis). Inicialmente se evaluó la expresión relativa de PPAR γ , debido a su relación con las funciones adipogénicas. De acuerdo con los resultados observados, la expresión de este factor de transcripción no presenta diferencias significativas en los grupos con adición de TP y/o mayor aporte energético por lípidos (CTP, H y HTP).

De forma interesante, se ha establecido que, durante el desarrollo de la obesidad, la expresión de PPAR γ no se ve sujeta a una fuerte influencia. Sin embargo, el papel que desempeña en relación con la adipogénesis y la reducción de la infiltración de macrófagos y la inflamación, son funciones que pueden seguir activas en el tejido adiposo (Stienstra *et al.*, 2006).

Es importante resaltar que se observó cierta tendencia del grupo HTP a tener mayor expresión de PPAR γ . Dicha tendencia podría dar explicación a la reducción en el tamaño de los adipocitos observado en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio.

Adicional a la actividad de PPAR γ , la actividad de otros factores como la Proteína de Unión al Potenciador CCAAT (CCAAT-enhancer-binding protein α , C/EBP α) y otros, pudieran estar dando la diferencia en la adipogénesis y con esto, el tamaño de adipocitos que se determinó. Incluso se ha descrito que algunos genes presentan más dependencia a la actividad de C/EBP α , que a PPAR γ (Lefterova *et al.*, 2014). Es decir, que tanto el tamaño menor de adipocitos, como el peso menor de tejido adiposo pudieran estar dados por la actividad de factores adicionales a

PPAR γ , y entonces los comportamientos observados sean regulados parcialmente por este factor de transcripción.

Por otra parte, la expresión de la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) es mayor en el tejido adiposo, en comparación con cualquier otro tejido (Hotamisligil & Bernlohr, 2015).

La expresión relativa similar de FABP4 en todos los grupos de trabajo, sugiere que la vía lipolítica es similar, independientemente de la dieta administrada. La tendencia a aumentar en el grupo HTP puede ser debida al aumento de la actividad de PPAR γ por la presencia del TP, potenciando la transcripción de FABP4.

Así mismo, esta tendencia puede suponer un efecto mayor de la proteína y por lo tanto un aumento en la migración de ácidos grasos libres del tejido adiposo hacia la circulación y, por ende, reducción en la adiposidad de estos ratones.

Para corroborar que el leve aumento en la expresión de FABP4 es una de las causas por las que el tejido adiposo de los ratones HTP es menor, es necesario evaluar otras enzimas involucradas en la vía lipolítica, ya sea por su regulación a largo plazo (regulación transcripcional) o por regulación a mediano plazo (modificaciones covalentes). Algunas de las enzimas que pueden ser evaluadas son la adiposo triglicéridos lipasa (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) o la perilipina 1 (Nielsen, 2014).

Se ha establecido que la ATGL es la lipasa responsable del inicio en la hidrólisis de triacilglicéridos para producir diacilglicéridos y un ácido graso libre. La activación de ATGL ocurre mediante la unión al cofactor CGI-58 (Comparative-Gene Identification 58) mediante interacción proteína-proteína que ocurre en la superficie de la vacuola lipídica. Así

mismo, se ha descrito que agonistas de PPAR γ aumentan la expresión del mRNA de ATGL (Lass *et al.*, 2011).

Con respecto a HSL, se ha estudiado ampliamente que la fosforilación en los residuos Ser650, en humanos, y Ser660, en roedores, es particularmente importante para la actividad enzimática dirigiendo al incremento de la actividad cercano al doble (Lass *et al.*, 2011).

Finalmente, la perilipina 1 actúa como plataforma dinámica para coordinar el acceso de las enzimas a la vacuola lipídica en respuesta al estado metabólico del adipocito. La fosforilación del residuo Ser517 de la perilipina 1 es clave en la regulación de la lipólisis (Frühbeck *et al.*, 2014).

Una vez establecido que la expresión de PPAR γ no presentó diferencias significativas y que la actividad de FABP4 no explica de forma concluyente el estado de actividad de la vía lipolítica de los grupos de trabajo, es necesario evaluar las alteraciones en la vía lipogénica, para lo cual, se determinó la expresión relativa de SCD1 y PECK.

En la evaluación de la expresión de SCD1 no se observó diferencia significativa entre los grupos de dietas, sin embargo, se presenta tendencia de elevación en la expresión en los grupos adicionados con TP. Se ha establecido de forma directa que SCD1 es un gen blanco de PPAR γ . Así mismo, está establecido que esta enzima es limitante de la reacción de desaturación de lípidos endógenos (Yao-Borengasser *et al.*, 2008).

Una razón para la tendencia de aumento en la regulación transcripcional de esta proteína es la asociación de PPAR γ con el TP. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto que tiene la administración exógena del isómero *trans* del palmitoleato en la actividad enzimática y la regulación de la desaturación.

La actividad de PEPCCK está integrada en la vía gliceroneogénica, ya que cataliza la síntesis de glicerol-3-fosfato necesario para la re-esterificación de ácidos grasos. En los resultados observados sobre la expresión de este transcrito se estableció diferencia significativa entre el grupo HTP y los grupos C y H, y similitud con el grupo CTP.

Al igual que SCD1, se ha establecido de manera clara que PEPCCK es un gen blanco de la actividad de PPAR γ (Franckhauser *et al.*, 2002). Debido a esto, la similitud en la expresión de PEPCCK entre los grupos CTP y HTP puede deberse a la asociación del TP con PPAR γ , para favorecer la transcripción de estos genes diana.

Sin embargo, el aumento en la actividad de PEPCCK sugiere que la vía lipogénica en los ratones CTP y HTP está activa y por lo tanto aumentaría el almacenamiento de triacilglicéridos en el tejido adiposo. Esta afirmación se opone a la observación en el tamaño de los adipocitos en ambos grupos (Figura 14). La regulación post transcripcional de esta ruta metabólica debe estar jugando un papel importante para determinar la reducción tanto en el tamaño celular como en la reducción en el peso del tejido adiposo.

Finalmente, una última posibilidad para explicar la reducción de peso en el grupo HTP es el posible efecto de pardeamiento de los adipocitos blancos. Se ha propuesto que la diferenciación de adipocitos blancos a adipocitos beige se debe a diversos estímulos, entre ellos la activación de PPAR γ que conduce al aumento en el número de mitocondrias dentro del adipocito blanco, aparición del fenotipo multilocular (característico de los adipocitos pardos) y aumento en la termogénesis adaptativa mediada por la actividad de UCP1 (Park *et al.*, 2014).

Para que este fenómeno se corroborara y diera una posible explicación de la reducción del tejido adiposo blanco en el grupo HTP, se debería reflejar en el aumento en la expresión de UCP1 en dicho grupo. Sin embargo, no se estableció diferencia estadística entre los grupos.

Esto es opuesto a lo establecido en la literatura y los resultados observados, ya que el grupo H presento el mayor peso corporal de todos los grupos, así como la mayor área de adipocitos y el mayor peso de tejido adiposo epididimal y mesentérico. Por lo que la sobre expresión observada de UCP1 no se traduce en actividad enzimática que genere un gasto energético en forma de calor.

Para confirmar estos resultados, es necesario evaluar la actividad de la proteína madura y correlacionar con los resultados fisiológicos observados.

9. CONCLUSIONES

La administración de TP en conjunto con una dieta alta en lípidos previene el aumento en la masa del tejido adiposo y peso corporal, y la hipertrofia en los adipocitos (Figura 17), comparando con la administración de dieta alta en lípidos sin TP.

La administración de TP a un modelo murino de obesidad inducida por dieta no presenta un efecto protector contra alteraciones en el metabolismo de glucosa. Finalmente, aumenta la expresión de la enzima PEPCCK, asociada a la lipogénesis en el tejido adiposo blanco.

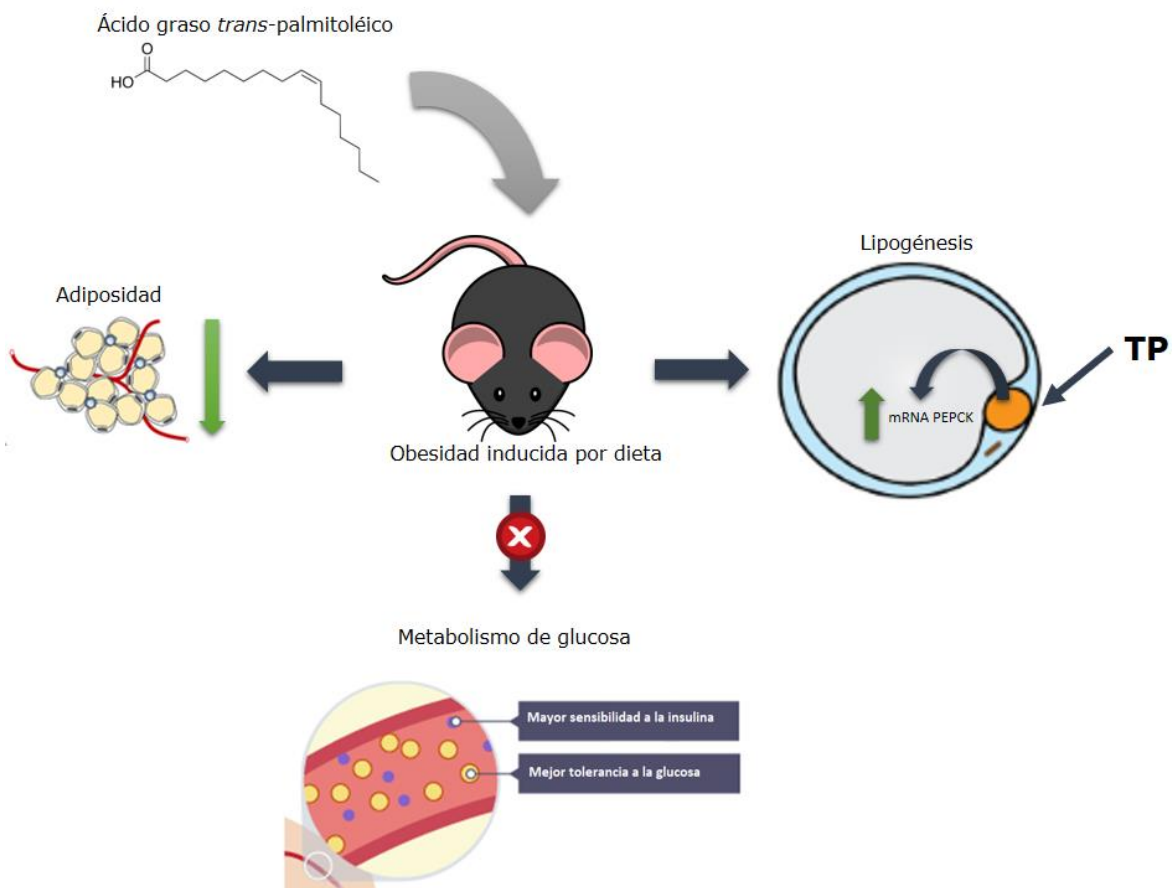


Figura 17. La administración de TP a un modelo murino de obesidad inducida por dieta reduce la adiposidad, no presenta efecto sobre el metabolismo de la glucosa y aumenta la expresión de PEPCCK, asociada a la lipogénesis.

Una posible explicación se deba a que la regulación transcripcional está acompañada de regulaciones por modificaciones covalentes e incluso con regulaciones por retroalimentación que alteran la función de las enzimas involucradas en estas rutas metabólicas.

10. PERSPECTIVAS

En futuros trabajos se deberán evaluar posibles modificaciones en las vías estudiadas en el presente trabajo, así como en las vías de oxidación de lípidos que den una posible explicación a la reducción de la adiposidad observada en los ratones. Así mismo, es de gran relevancia conocer el estado metabólico del hígado, debido a la relación entre su función y la homeostasis energética.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelaal, M., le Roux, C. W. & Docherty, N. G. (2017). Morbidity and mortality associated with obesity. *Annals of Translational Medicine*, 5(7), 1-12.
- Ahmadian, M., Wang, Y. & Sul, H. S. (2010). Lipolysis in adipocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(5), 555-559.
- ALJohani, A. M., Syed, D. N. & Ntambi, J. M. (2017). Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 regulation of systemic metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism. Cell Press*, 28(12), 831-842.
- Aquino-Bolaños, E. N., Mapel-Velazco, L., Martín-del-Campo, S. T., Chávez-Servia, J. L., Martínez, A. J. & Verdalet-Guzmán, I. (2017). Fatty acids profile of oil from nine varieties of macadamia nuts. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1262-1269.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. Jr. & Stryer, L. (2015). *Biochemistry*. 8th Edition. New York: W. H. Freeman and Company, 554-556, 668-669.
- Body, D.R. (1988). The lipid composition of adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 27(1), 39-60.
- Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798-808.
- Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A. & Thorens, B. (2001). Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(4), E834-E842.

- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M. & Hotamisligil, G. S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*, 134(6), 933-944.
- Da Silva, M. S., Julien, P., Couture, P., Lemieux, S., Vohl, M. C. & Rudkowska, I. (2014). Associations between dairy intake and metabolic risk parameters in a health French-Canadian population. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 39(12), 1323-1331.
- Dehghan, M., Mente, A., Rangarajan, S., Sheridan, P., Mohan, V., Iqbal, R., Gupta, R., Lear, S., Wentzel-Viljoen, E., Avezum, A., Lopez-Jaramillo, P., Mony, P., Varma, R.P., Kumar, R., Chifamba, j., Alhabib, K. F., Mohammadifard, N., Oguz, A., Lanus, F., Rozanska, D., Bostrom, K. B., Yusoff, K., Tsoikile, L. P., Dans, A., Yusufali, A., Orlandini, A., Poirier, P., Khatib, R., Hu, B., Wei, L., Yiu, L., Deereali, A., Yeates, K., Yusuf, R., Ismail, N., Mozaffarian, D., Teo, K., Anand, S. S. & Yusuf, S. (2018). Association of dairy intake with cardiovascular disease and mortality in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 105(2), 141-150.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V. & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151(2), 400-413.
- Forest, C., Tordjman, J., Glorian, M., Duplus, E., Chauvet, G., Quette, J., Beale, E. G. & Antoine, B. (2003). Fatty acid recycling in

adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxikinase. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1125-1129.

Franckhauser, S., Muñoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B. & Bosch, F. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 51(3), 624-630.

Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S. & Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition Research Reviews*, 27(1), 63-93.

Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K. & Miura, T. (2014). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 8(S3), 23-33.

Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal*, 13(1), 17.

Hariri, N. & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutritional Research Reviews*, 23(2), 270-299.

Hirahatake, K. M., Slavin, J. L., Maki, K. C., & Adams, S. H. (2014). Associations between dairy foods, diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 63(5), 618-627.

Hotamisligil, G. & Bernlohr, D. A. (2015). Metabolic functions of FABPs – mechanisms and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 592-605.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2017. *Principales causas de mortalidad*. [En línea] (Actualizado a 2016). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/PC.asp?t=14&c=11817> [Último acceso el 24 de julio de 2018].
- Jensen, T. L., Kiersgaard, M. K., Sørensen, D. B. & Mikkelsen, L. F. (2013). Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals*, 47(4), 225-240.
- Johnson, A. M. & Olefsky, J. M. (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *Cell*, 152(4), 673-684.
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. (2015). Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell metabolism*, 22(4), 546-559.
- Khan, B. B. & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473-481.
- Kim, Y. C. & Ntambi, J. M. (1999). Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase genes: Role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(1), 1-4.
- Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current opinion in pharmacology*, 29, 77-89.
- Kolditz, C- I. & Langin, D. (2010). Adipose tissue lipolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(4), 377-381.
- Kratz, M., Marcovina, S., Nelson, J. E., Yeh, M. M., Kowdley, K. V., Callahan, H. S., Song, X., Di, C. & Utzschneider, K. M. (2014). Dairy fat intake is associated with glucose tolerance, hepatic and systemic insulin sensitivity, and liver fat but not β -cell function in

- humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(6), 1385-1396.
- Kunešová, M., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Staňková, B., Kalousková, P., Viguerie, N., Larsen, T. M., Van Baak, M. A., Jebb, S. A., Martinez, J. A., Pfeiffer, A. F. H., Kafatos, A., Handjieva-Darlenska, T., Hill, M., Langin, D., Žák, A., Astrup, A. & Saris, W. H. M. (2012). Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weight loss and weight maintenance: the DIOGENES study. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 61(6), 597.
- Kushner, R. (2014). Weight loss strategies for treatment of obesity. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 56(4), 465-472.
- Kusminski, C. M., Bickel, P. E., & Scherer, P. E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature reviews Drug discovery*, 15(9), 639.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2016. *PPAR signaling Pathway*. [En línea] (Actualizado al 6 de marzo de 2016). Disponible en: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu03320 [Último acceso el 11 de noviembre de 2018].
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. & Zechner, R. (2011). Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 14-27.
- Lefterova. M. I., Haakonson, A. K., Lazar, M. A. & Mandrup, S. (2014). PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology and Metabolism. Cell Press*, 25(6), 293-302.
- Levin, B. E. & Dunn-Meynell, A. A. (2002). Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-

- induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1), R46-R54.
- Lichtenstein, A. H. & Schwab, U. S. (2000). Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*, 150(2), 227-243.
- Ma, X., Wang, D., Zhao, W. & Xu, L. (2018). Deciphering the Roles of PPAR γ in Adipocytes via Dynamic Change of Transcription Complex. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 473.
- Mann, T., Tomiyama, A. J., Westling, E., Lew, A.-M., Samuels, B., & Chatman, J. (2007). Medicare's search for effective obesity treatments: Diets are not the answer. *American Psychologist*, 62(3), 220-233.
- Matafome, P. & Seça, R. (2017). Function and dysfunction of adipose tissue en: L. Letra & R. Seça eds. *Obesity and Brain Function. Advances in Neurobiology*. Cham: Springer, 3-31.
- Millward, C. A., DeSantis, S., Hsieh, C. W., Heaney, J. D., Pisano, S., Olswang, Y., Reshef, L., Beidelschies, M., Puchowicz, M. & Croniger, C. M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(6), 1452-1463.
- Miyazaki, M., Bruggink, S. M. & Ntambi, J. M. (2006). Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Δ 9-desaturase. *Journal of Lipid Research*, 47(4), 700-704.
- Mozaffarian, D., Cao, H., King, I. B., Lemaitre, R. N., Song, X., Siscovick, D. S. & Hotamisligil, G. S. (2010). Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factor, and new-onset diabetes in US adults. *Annals of internal medicine*, 153(12), 790-799.

- Mozaffarian, D., De Oliveira Otto, M. C., Lemaitre, R. N., Fretts, A. M., Hotamisligil, G., Tsai, M. Y., Siscovick, D. S. & Nettleton, J. A. (2013). *Trans*-palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 854-861.
- Nauck, M. A. & Meier, J. J. (2018). Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism. A Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 20(S1), 5-21.
- Neeland, I. J., Ayers, C. R., Rohatgi, A. K., Turer, A. T. Berry, J. D., Das, S. R., Vega, G. L., Khera, A., McGuire, D. K., Grundy, S.M. & De Lemos, J. A. (2013). Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity*, 21(9), E439–E447.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan, 804-807.
- Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N. & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3), R199-R222.
- Ntambi, J. M. & Miyazaki, M. (2004). Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 43(2), 91-104.
- O’connor, S. & Rudkowska, I. (2017). Dietary Fatty Acids and the Metabolic Syndrome: A Personalized Nutrition Approach. En: D. Rodríguez-Lázaro ed. *Advances in Food and Nutrition Research*. Cambridge: Academic Press, 1-86.

- Ojha, S. & Budge, H. (2014). Early origins of obesity and developmental regulation of adiposity. En: M. E. Symonds ed. *Adipose Tissue Biology*. Nottingham: Springer, 427-456.
- Oka, R., Yagi, K., Sakurai, M., Nakamura, K., Nagasawa, S. Y., Miyamoto, S., Nohara, A., Kawashiri, M. A., Hayashi, K., Takeda, Y. & Yamagishi, M. (2012). Impact of Visceral Adipose Tissue and Subcutaneous Adipose Tissue on insulin resistance in middle-aged Japanese. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 19(9), 814-822.
- Park, A., Kim, W. K. & Bae, K. H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), 33-42.
- Patel, P. & Abate, N. (2013). Body fat distribution and insulin resistance. *Nutrients*, 5(6), 2019-2027.
- Rutkowski, J. M., Stern, J. H. & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *Journal of Cell Biology*, 208(5), 501-512.
- Sánchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. (2014). Adipocyte Lineages: Tracing Back the Origins of Fat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 340-351.
- Schwab, U., Lauritzen, L., Tholstrup, T., Haldorsson, T. I., Riserus, U., Uusitupa, M. & Becker, M. (2014). Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food & Nutrition Research*, 58(1), 25145.
- Secretaria de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. 2016. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino ENSANUT. Informe de Resultados*. [En línea] (Actualizado al 31 de octubre de 2016).

Disponible en:
http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf [Último acceso el 26 de julio de 2018].

Stienstra, R., Duval, C., Müller, M. & Kersten, S. (2007). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Research*, 2007, 1-10.

Trayhurn, P. & Beattie J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 329-339.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2011). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. Hoboken: Wiley, 969-971.

Wirth, A., Wabitsch, M., & Hauner, H. (2014). The prevention and treatment of obesity. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(42), 705.

World Health Organization. 2017. *Obesity and overweight*. [En línea] (Actualizado a febrero de 2018). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> [Último acceso el 31 de julio de 2018].

World Health Organization. 2017. *Global Health Observatory (GHO) data*. [En línea] (Actualizado al 22 de septiembre de 2017). Disponible en: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A896?lang=en> [Último acceso el 28 de agosto de 2018].

Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D. & Tso, P. (2003). A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(4), 1081-1087.

- Wronska, A. & Kmiec, Z. (2012). Structural and biochemical characteristics of various adipose tissue depots. *Acta Physiologica*, 205(2), 194-208.
- Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J., Sternbach, d. D., Lehmann, J. M., Wisely, G. B., Willson, T. M., Kliewer, S. A. & Milburn, M. V. (1999). Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Molecular Cell*, 3(3), 397-403.
- Yao-Borengasser, A., Rassouli, N., Varma, V., Bodles, A. M., Rasouli, N., Unal, R., Phanavanh, B., Ranganathan, G., McGehee, R. E. Jr. & Kern, P. A. (2008). Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 gene expression increases after Pioglitazone treatment and is associated with Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor- γ responsiveness. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(11), 4431-4439.

12. ANEXO I. COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS DE TRABAJO

OpenSource Diets®

| Producto | C | | H | | CTP | | HTP | |
|--------------------|------|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| | g | kcal (%) | g | kcal (%) | g | kcal (%) | g | kcal (%) |
| Proteína | 19.2 | 20 | 24 | 20 | 19 | 20 | 24 | 20 |
| Hidrato de carbono | 67.3 | 70 | 41 | 35 | 67 | 70 | 41 | 35 |
| Grasa | 4.3 | 10 | 24 | 45 | 4.3 | 9 | 23 | 44 |
| Total | | 100 | | 100 | | 99 | | 99 |
| kcal/g | 3.8 | | 4.7 | | 3.8 | | 4.7 | |

| Ingrediente | g | kcal | g | kcal | g | kcal | g | kcal |
|---|----------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|---------------|-------------|
| Caseína | 200 | 800 | 200 | 800 | 200 | 800 | 200 | 800 |
| L-Cistina | 3 | 12 | 3 | 12 | 3 | 12 | 3 | 12 |
| Almidón de maíz | 452.2 | 1809 | 72.8 | 291 | 452.2 | 1809 | 72.8 | 291 |
| Maltodextrina 10 | 75 | 300 | 100 | 400 | 75 | 300 | 100 | 400 |
| Sucrosa | 172.8 | 691 | 172.8 | 691 | 172.8 | 691 | 172.8 | 691 |
| Celulosa (BW200) | 50 | 0 | 50 | 0 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| Aceite de soya | 25 | 225 | 25 | 225 | 25 | 225 | 25 | 225 |
| Lardo | 20 | 180 | 0 | 0 | 20 | 152 | 0 | 0 |
| Aceite de palma | 0 | 0 | 177.5 | 1598 | 0 | 0 | 174.92 | 1574 |
| Ácido <i>trans</i> -palmitoleico | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.165 | 28 | 2.58 | 23 |
| Mezcla de minerales S10026 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Fosfato dicálcico | 13 | 0 | 13 | 0 | 13 | 0 | 13 | 0 |
| Carbonato de calcio | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 |
| Citrato de potasio monohid. | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 |
| Mezcla de vitaminas V10001 | 10 | 40 | 10 | 40 | 10 | 40 | 10 | 40 |
| Bitartrato de colina | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Colorante amarillo FD&C #5 | 0.04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.025 | 0 |
| Colorante rojo FD&C #40 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0.05 | 0 | 0 | 0 |
| Colorante azul FD&C #1 | 0 | 0 | 0.05 | 0 | 0 | 0 | 0.025 | 0 |
| TOTAL | 1055.05 | 4057 | 858.15 | 4057 | 1055.05 | 4057 | 858.15 | 4057 |
| Ácido <i>trans</i> -palmitoleico (g/kg) | | | | | 3.0 | | 3.0 | |