



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efectos metabólicos del aceite de soya y la microbiota intestinal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q. Jonathan Martín Benítez Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Armando Roberto Tovar Palacio, INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Samuel Canizales Quinteros, Facultad de Química, UNAM

Jose Pedraza Chaverri, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo costo mucho esfuerzo, pero sobre todo pasión y amor. En primer lugar, quisiera agradecer enormemente al Dr. Armando Tovar Palacio por todas las facilidades otorgadas a lo largo de este proyecto. Me apoyo de manera sólida, constante y solidaria. Más por la oportunidad de haber trabajado en su laboratorio que disfrute impacientemente día a día. Pero sobre todo porque me enseñó a trabajar de manera dura y dedicada. Siempre enseñándonos a ser solidarios con los compañeros de trabajo. Esa es la formula del éxito.

Luego, quisiera agradecer a la Dra. Nimbe Torres por su colaboración en este proyecto, por sus contribuciones y consejos dados para la culminación de este proyecto. Siempre me fue muy grato ver su dedicación ardua al trabajo y su compromiso por la ciencia. En este mismo tenor quisiera agradecer al Dr. Pedraza Chaverri y al Dr. Samuel Canizalez quienes siempre me dejaron dislumbrado por sus aportaciones de conocimientos al tema.

Asimismo, quisiera agradecer profundamente a mi mama, la Lic. Yolanda Ramirez Galvez quien me ha apoyado a lo largo de mi carrera. Mamá linda, te doy gracias por siempre estar junto a mi y darme el ejemplo de la vida; no hay que rendirse nunca y que todo esfuerzo tiene recompensa. Eres para mi una mamá responsable y dedicada y la persona que más admiro en la vida. He pasado a lo largo de mi tiempo, increíbles momentos a tu lado, que siempre estarán en mi recuerdo, serán inolvidables. Te quiero mucha mamá. En este mismo tenor quisiera agradecer a mis primos Luis Toledo y Axel Toledo quienes fueron una parte importante en mi vida y a mis tios Luis Gabriel Toledo y Edmundo Ariel Toledo.

He tenido la fortuna de tener un amigo muy especial, Raziel Luque Zacarías, a quien ahora se ha convertido como mi hermano. Me da gusto que me hayas acompañado en mi titulación de licenciatura y ahora de maestría. Creo que eres la persona que emana el significado de lealtad y amistad pura, porque nos hemos peleado y a veces, no nos hemos entendido, pero siempre ha existido esa hermanadad de ayudarnos. Creo que para mí no ha habido momentos más especiales y experiencias inolvidables mas que contigo. Espero que esta amistad y ahora casi hermandad, siga continuando. Creo que solo los dos nos hemos entendido y nos hemos dado fuerza para continuar en esta vida tan difícil. Gracias por todos aquellos momentos que hemos pasado.

Hay otra persona que quisiera agradecer enormemente, Monica Todd Curie Sanchez. No se por donde empezar contigo. Creo que lo que más me impacta de ti, es que puedes tomar desiciones correctas en momento difíciles. He vivido momentos inolvidables a tu

lado, momentos de amor, cariño y comprensión. Tengo la certeza que eres la persona más inteligente que yo he conocido en esta vida. Espero en algún momento que trabajemos juntos y si no es posible, pues agradecerte por darme un poco de tu tiempo. Aunque ahora te has apartado de mi lado, yo siempre recordare esas tardes en el lab cuando le dabamos de comer a las ratitas, hacíamos PCR tiempo real y preparábamos bibliotecas genómicas para hacer las secuenciamientos. Asi mismo esas tardes que nos quedábamos hacer Western blot o a medir la cantidad de DNA en el nanofotometro. Tambien te agradezco que me hayas acompañado a mi titulación de licenciatura, fue inolvidable y ahora de maestría. Siempre estará abierto mi corazón para cuando quieras regresar, pero si no, pues me llevare un muy buen recuerdo que jamas olvidare. No olvidando el momento que conocimos a el autor de ese libro de bioquímica que causa tanto estrés generación tras generación: Albert Lehninger, aunque ya después no lo quieras soltar.

Otra persona a la que quisiera agradecer mucho es a la Maestra en ciencias Valeria Lopez, por todo su apoyo y cariño otorgado en este proyecto. Creo que no hubiera sido posible sin ella.

No me queda más que agradecer a todos mis amigos, todos sin duda me han aportado algo importante en mi vida. Hermano Cristian Garcia Rosas, gracias por todas esas enseñanzas que nos has otorgado a mi y a Raziel. Al Dr. Carlos Rius y al Dr. Hector Torres por su enorme disciplina que me enseñaron en el estudio de la Química. Por ultimo quiero agradecer a las siguientes personas: Renata Solorio, por todo su cariño; Alan Kevin Garcia Rosas; al laboratorio de Fisiología del Zalvador Zubiran; a la Facultad de Química; al Conacyt, por su apoyo otorgado; a Norma Velazquez por todo su apoyo y amistad; a mis amigas Vanesa Herrera Sanchez y a Adriana Perez Alvarado por todo su apoyo y las experiencias que hemos convivido y a la Lic. Claudia Ledesma por su amistad incondicional.

ÍNDICE

Abreviaciones utilizadas.....	6
RESUMEN	7
Introducción	10
1.1 Ácidos grasos.....	10
1.1.1 Propiedades químicas de los ácidos grasos.....	10
1.1.2 Biosíntesis de ácidos grasos saturados en animales.....	12
1.1.3 Formación de Ácidos grasos insaturados.....	12
1.1.4 Clasificación de ácidos grasos insaturados.....	16
1.1.5 Ácidos grasos esenciales.....	17
1.1.6 Ácidos grasos y efectos en la salud.....	19
1.1.7 Los ácidos grasos esenciales pueden regular procesos a nivel genético.....	19
1.1.8 Ácidos grasos y Diferenciación celular.....	21
1.1.9 Mecanismo Molecular de Maduración de adipocitos blancos.....	21
1.1.10 Salud y consumo de ácidos grasos.....	23
1.1.11 Mecanismo molecular del proceso de hipertrofia.....	23
1.1.12 Mecanismo molecular de la inhibición del proceso de hipertrofia a nivel genético.....	24
1.2 Microbiota Intestinal.....	25
1.2.1 Aspectos generales.....	25
1.2.2 Microbiota y alimentación.....	26
1.2.3 Microbiota y respuesta inmunológica.....	27
1.2.4 Microbiota y Obesidad.....	28
1.2.5 Consumo de ácidos grasos y microbiota intestinal.....	29
1.2.6 Microbiota y captación de Energía de los Alimentos.....	33
1.3 Aceite de soya.....	34
1.4 TEJIDO ADIPOSO.....	35
1.4.1 Tejido adiposo blanco y pardo.....	35
1.4.2 Morfología del tejido adiposo.....	36
1.4.3 Funciones del tejido adiposo blanco.....	37
1.4.4 Localización de tejido adiposo blanco y pardo.....	38
1.4.5 Apardamiento del Tejido Blanco.....	38
1.4.6 Mecanismo molecular.....	38
Justificación.....	39
Hipótesis.....	40
Objetivo general.....	40
Objetivos específicos.....	40
Metodología.....	41
Animales.....	41
Dietas.....	42
División de Grupos.....	43
Pruebas Bioquímicas.....	43
Análisis de sensibilidad a la Insulina y de tolerancia a la glucosa.....	44
Gasto energético.....	44

Extracción de RNA.....	44
Cuantificación relativa de PCR en tiempo real	45
Secuenciamiento del gen 16 S ribosomal.....	47
PCR de los filums de la microbiota.....	48
Histologías	49
Análisis de cuantificación de proteínas por western blot.....	51
Análisis estadístico.....	52
Resultados.....	53
Peso relativo de los órganos.	54
Determinaciones Bioquímicas.....	55
Curvas de tolerancia a la glucosa	57
Sensibilidad a la insulina	58
Análisis histológico del tejido adiposo blanco y pardo	59
Calorimetría indirecta	60
RT-PCR	64
Disminución del marcador UCP-1 de apardamiento de tejido adiposo blanco.	65
Análisis de la Microbital Intestinal por Secuenciación del Gen Ribosomal 16S.....	67
La dieta AIN93 G favorece un cambio en la población bacteriana de la microbiota.	68
Abundancia a nivel de Filum de la microbiota, el consumo de grasa crónico genere el crecimiento del filo bacteriano <i>Tenericutes</i>.	69
Análisis por PCR de la composición de la microbiota.....	70
Discusión y conclusiones.....	73

Abreviaciones utilizadas	
PGC1 α	Coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma
SREBP	Proteínas de unión a los elementos regulatorios esteroides
UCP-1	Proteína desacoplante 1
Tissue lyzer	Lisador de tejido
AGS	Ácidos grasos saturados
AGI	Ácidos grasos insaturados
Δ	Desaturasas
PPAR γ	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado-gamma
C/EBP1	Proteína de unión al potenciador
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
PKA	Proteína quinasa
PPARE	Elementos de respuesta de ppar

ARA	Ácido araquidónico
DHA	Ácido docoxehanoico
EPA	Ácido eicosapentanoico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
PGE	Prostaglandinas
TXT	Tromboxanos
RXR	Receptor x reptinoide
(PGI ₂)	Prostaciclina
LPL	Lipoproteína lipasa
(GLUT4)	Transportador de glucosa 4
(SCOAD)	Esteroil coenzima desaturasa
(EAGS)	Ácido graso sintasa
KLF'S	Factores KRÜPPEL
(CHREBP1)	Proteína de unión al elemento regulador esteroil,
(PREF-1)	Factor preadipocito, lipasa de lipoproteína
(CREB)	Elemento de respuesta de camp
ZFP43	Proteína de dedo de zinc
FAB4	Proteína de unión a Ácidos grasos
PEPCK,	Fosfoenolpiruvatoquinasa

RESUMEN

El intestino grueso es un nicho ecológico que está colonizado por comunidades de microorganismos que desempeñan funciones importantes para la salud. Al conjunto de estas comunidades se les denomina microbiota intestinal y las más estudiadas han sido las bacterias. En las últimas décadas se ha visto que algunas bacterias pertenecientes al filo de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* tienen la capacidad de participar en los procesos metabólicos de obtención de energía dentro de las células; procesos de diferenciación celular como el *apardeamiento* (*browning*) y procesos inmunológicos relacionados con la inflamación. Existen factores que alteran estos procesos (disbiosis), entre los que destacan la forma

de nacimiento, la higiene ambiental, pero de manera muy importante la dieta. Algunos alimentos pueden provocar alteraciones en estos nichos ecológicos de forma que se exacerben procesos de inflamación provocados por las bacterias patógenas. Esto hace que se favorezcan las condiciones necesarias para el desarrollo de ciertas enfermedades como la obesidad. En la obesidad, estas comunidades además de favorecer estos cambios provocan además otras alteraciones entre ellas, el desarrollo de resistencia a la insulina, hígado graso y dislipidemias, lo cual no se sabe si es provocado con certeza por el mismo consumo de alimentos o sea un provocado por el conjunto de los dos, los alimentos y la microbiota intestinal en conjunto. Por lo que se vuelve importante estudiar la respuesta que tiene la microbiota intestinal ante el consumo de ellos para comprender la influencia que tienen los alimentos sobre los mecanismos de acción activados por las bacterias para favorecer procesos de inflamación y captación de energía que favorecen la acumulación de adiposidad en el organismo.

Diversos estudios han mostrado que cada uno de los componentes de la dieta puede modificar de manera selectiva a la microbiota intestinal, y recientemente ha cobrado importancia el hecho de que algunos tipos de grasas consumidas pueden tener un efecto benéfico o perjudicial según sea el origen de obtención de la grasa, que puede ser animal o vegetal. Uno de los aceites más consumidos en la dieta humana es el aceite de soya y el cual se caracteriza por tener un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente el ácido linoleico y el α -linolénico.

Por lo que el motivo de la presente investigación fue el estudiar en ratones si el consumo de una dieta con un contenido elevado de aceite de soya al 21% genera cambios metabólicos selectivos sobre la ganancia de peso; parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL; tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina; así como también sobre el gasto energético, la morfología del tejido adiposo blanco y la capacidad potencial

de apardeamiento (browning) del tejido adiposo blanco en comparación con una dieta estándar que usa aceite de soya al 7%. Además, analizar si se el consumo de este aceite genera cambios en la composición de la microbiota como respuesta ante su consumo, analizados por la secuenciación del gen 16s ribosomal, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pudieran indicar una posible relación con los cambios metabólicos.

Los resultados mostraron con certeza que el consumir un exceso de aceite de soya generaba una ganancia significativa sobre el peso, el contenido de grasa corporal, las concentraciones de colesterol total y LDL y todo esto aunado a una menor tolerancia a la glucosa y a una significativa disminución en la sensibilidad a la insulina. Los estudios histológicos, por otra parte, demostraron que el mayor consumo de aceite de soya incremento el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco y por otro lado generó una alteración en la morfología de los adipocitos del tejido adiposo semejante al pardo (Beige). Estas alteraciones observadas por el elevado consumo de aceite de soya se vieron acompañadas por una disminución del gasto energético (VO_2). Parte de la explicación de la disminución del VO_2 estuvo asociado a una disminución en la expresión de marcadores de termogénesis, lo que indica una disminución en la capacidad de apardeamiento del tejido adiposo blanco. Finalmente, los datos del análisis de la microbiota intestinal demostraron que el consumo de una dieta alta en aceite de soya disminuye la diversidad de la microbiota intestinal y el análisis de beta diversidad, indico que la microbiota intestinal del grupo alimentado con aceite de soya al 21% es en parte diferente a la del grupo alimentado con 7% de aceite de soya, lo cual se vio reflejado principalmente en la abundancia relativa de los *Firmicutes* y de los *Tenericutes*, que se caracterizó por un incremento de aproximadamente al 47% en la población de *Tenericutes* de la muestra de aceite de soya al 21% con respecto a la del aceite de soya al 7% mientras que la población de *Fermicutes* incremento en un 10 % en la dieta del 21% con respecto a la del 7% . Por lo que se concluye que los efectos metabólicos benéficos que tiene el aceite de soya cuando se consume a la concentración

recomendada que cubre el requerimiento (7%) se pierden cuando se consume una dieta alta en aceite de soya (21%).

INTRODUCCIÓN

1.1 Ácidos grasos

1.1.1 Propiedades químicas de los ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas que tienen una estructura en forma de cadena y están formados por átomos de carbono (C) que se unen entre sí mediante enlaces covalentes simples (-) y en la parte terminal de la cadena, se encuentra un grupo carboxilo (COOH), como el ácido palmítico de la figura 1a. La longitud de la cadena puede ser variable, siendo los ácidos grasos cortos aquellos que tienen menos de 7 átomos de C, como el ácido pentanoico de la figura 1b, mientras que los ácidos grasos largos son los que están formados por más de 10 átomos de C, como el ácido palmítico de la figura 1a. Además, los ácidos grasos pueden presentar dobles enlaces (=) entre un átomo de carbono y otro como el ácido araquidónico y el ácido eicosapentanoico de la figura 1c y 1 d (Lehninger, 2014).

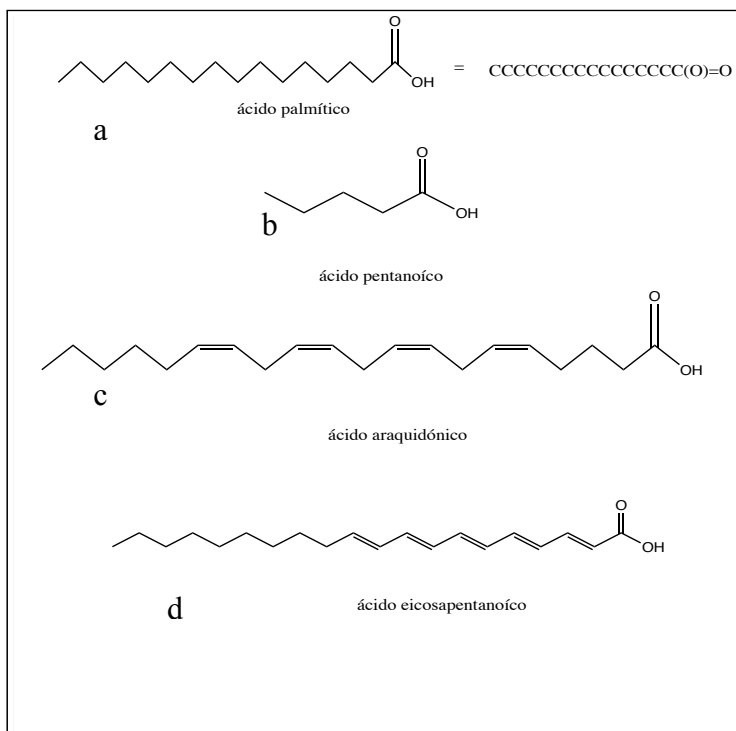


Figura 1. Representación esquemática de los ácidos grasos: a) Ácido palmítico, b) Ácido pentanoico, c) Ácido araquidónico y d) Ácido eicosapentanoico

Los átomos de carbono y el grupo carboxilo son regiones muy diferentes dentro de la molécula, siendo los átomos de carbono la parte hidrofóbica, esto es, la parte que no se disuelve en agua y el grupo carboxilo la parte hidrofílica, es decir, se puede disolver en agua. Esto hace que los ácidos grasos sean anfipáticos, siendo esta propiedad lo que hace que sean los bloques de construcción adecuados para la formación de membranas celulares ya que se necesita que por un lado el medio extracelular no pueda transitar al citoplasma, lo cual es posible por la hidrofobicidad para evitar la entrada de sustancias tóxicas y por otro lado se necesita que el contenido de la célula no pueda escapar, a menos que se necesite, lo cual es realizado por la parte hidrofílica. (Clayden 2001, Lehninger, 2014).

Los ácidos grasos pueden realizar diversas funciones a nivel celular. Pueden servir de precursores para la síntesis de mensajeros celulares, pueden formar

parte de las membranas celulares o servir como fuentes de energía en periodos prolongados de ayuno (Lehninger, 2014; Unger, 2001).

1.1.2 Biosíntesis de ácidos grasos saturados en animales

La síntesis de los ácidos grasos tiene principalmente lugar en el hígado y en el tejido adiposo. El primer paso de la síntesis inicia con la producción de los precursores **acetil-CoA y malonil -CoA**, a través de las enzimas **acetil -CoA carboxilasa** y **atp- citrato liasa**. Este paso es activado por la acumulación de **cittrato** en el citosol (Lehninger, 2014; Tovar et al., 2005).

El malonil-CoA y el acetil-CoA inician el siguiente paso de la síntesis, que consiste en añadir dos átomos de carbono al **acetil-CoA**, para obtener un intermediario de cuatro átomos de carbono, el **butiril-CoA** a través de la enzima **ácido graso sintasa**. La enzima **ácido graso sintasa** añade átomos de carbono mediante la descarboxilación de una molécula de **malonil-CoA**. Este proceso continua hasta sintetizar un ácido graso de 16 átomos de carbono, denominado ácido palmítico (figura 2). Los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos son el glucagón y epinefrina, cuando son concentraciones son altas que usualmente se presenta en periodos de ayuno largos (Lehninger, 2014).

1.1.3 Formación de Ácidos grasos insaturados

La formación de ácidos grasos insaturados a nivel celular comienza con el ácido palmítico como precursor, es transformado en ácido esteárico que es un ácido graso formado por 18 átomos de carbono y sintetizado a través de la **ácido graso sintasa** y **malonil-CoA**. El ácido esteárico es convertido después a un

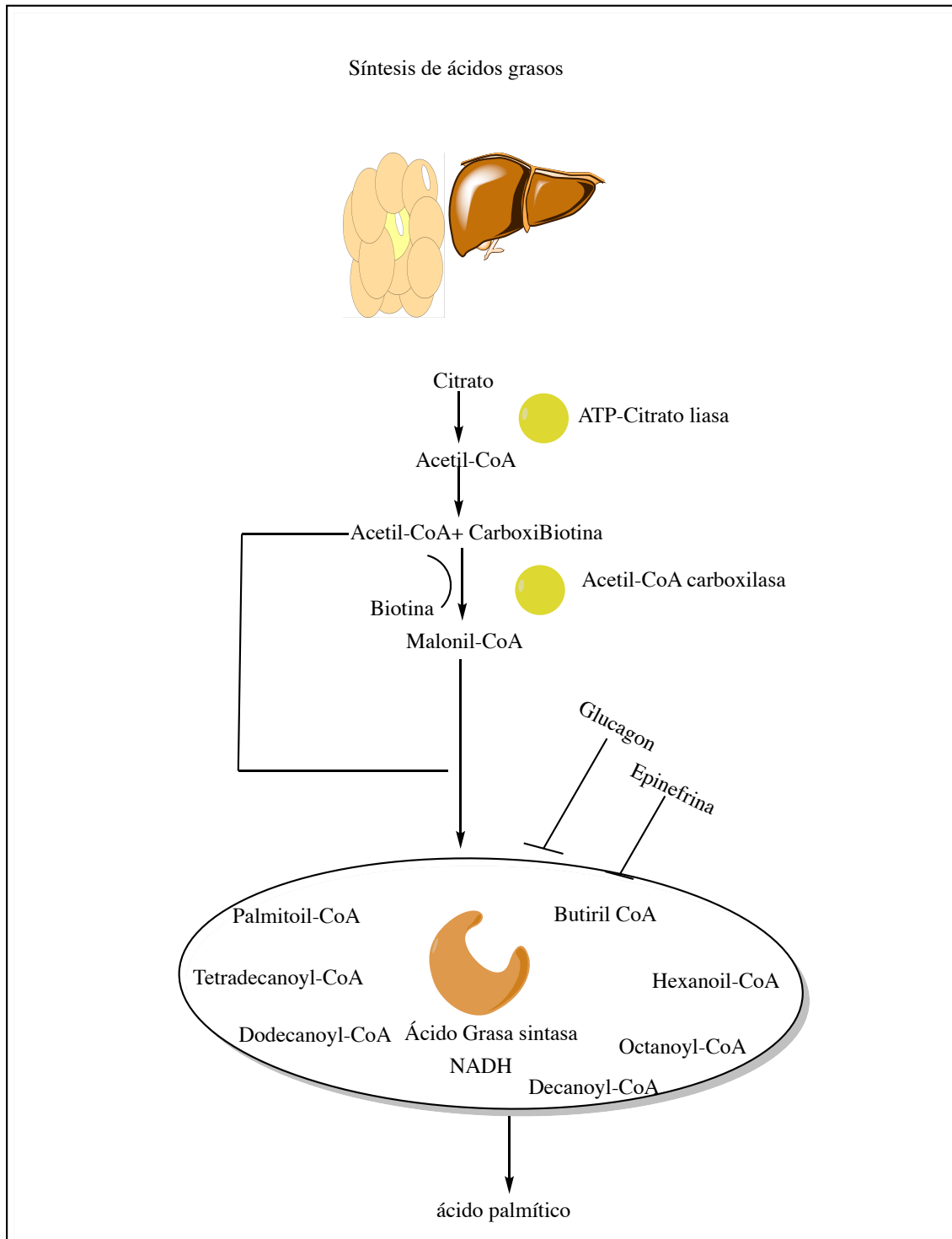


Figura 2. Ciclo de síntesis de ácidos grasos

ácido graso insaturado que tiene un doble enlace en la cadena y sintetizado por las desaturasas (Lenhninger,2012). Las desaturasas tienen tres isóformas, que se conocen como desaturasa 9, desaturasa 12 y desaturasa 15 ($\Delta 9$, $\Delta 12$ y $\Delta 15$). Deshidrogenan al ácido esteárico para formar un ácido graso con producir enlaces dobles en la cadena. Por su parte, la desaturasa 9 forma un doble enlace en la posición 9 para producir ácido oleico, un ácido graso con un enlace doble y 18 átomos de carbono. (figura 3, Oleato) (Lenhninger 2012; Tovar, 2005; Torres et al 2006).

Los siguientes dos dobles enlaces son insertados por la $\Delta 12$ y $\Delta 15$. Estas enzimas no las poseen los humanos, sino más bien se localizan en bacterias y plantas. Como consecuencia, insertan dobles enlaces en las posiciones 12 y 15 de la cadena. Sus productos son el ácido linoleico que tiene dos dobles enlaces en las posiciones 9 y 12 contando a partir del carboxilo terminal, y el ácido α -linolénico que presenta tres dobles enlaces en las en las posiciones 9, 12 y 15, los cuales son intermediarios para la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (figura 3) (Nelson, 2000; Specher et al.,1992).

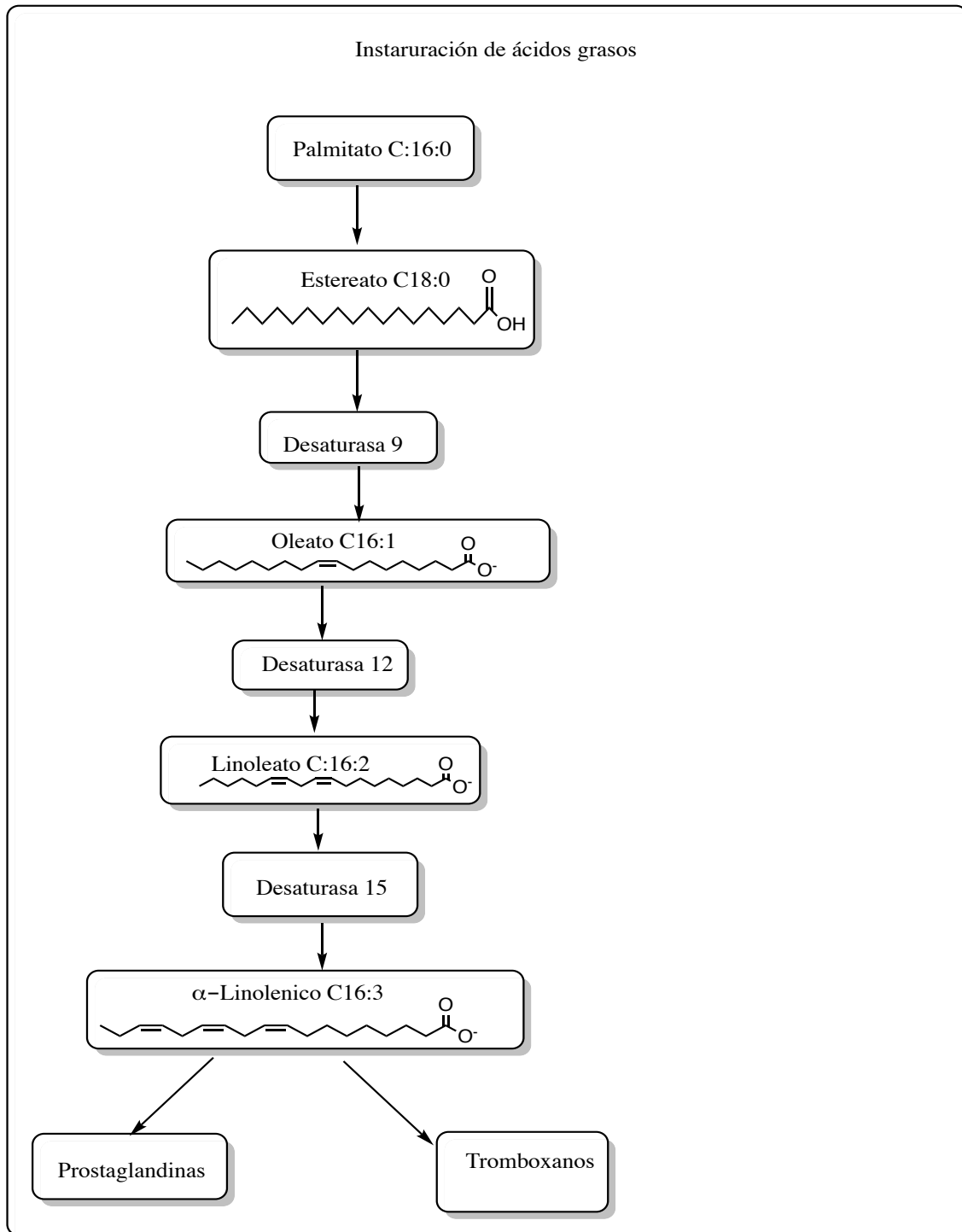


Figura 3. Proceso de síntesis de ácidos grasos insaturados

1.1.4 Clasificación de ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos insaturados que tienen dobles enlaces en las posiciones 12 y 15 como el ácido α -linolénico y el linoleico son llamados ácidos grasos omega 3 y omega 6 respectivamente. Esta denominación es porque se cuenta la cercanía que tienen los dobles enlaces con el carbono omega de la cadena, que es el carbón más alejado del grupo carboxilo (figura4). En cambio los dobles enlaces se encuentran a 12 carbonos de distancia y 15 del carboxilo terminal en el ácido α -linolénico(figura 4) (Díaz Villaseñor 2002; Ooi et.al, 2015).

Los ácidos grasos insaturados que presentan un solo doble enlace se denominan ácidos grasos monoinsaturados y los que presentan más de uno se denominan poliinsaturados (Díaz-Villaseñor et al 2013; Carey,2012).

Pueden existir ácidos grasos omega 3 y omega 6 monoinsaturados pero también poliinsaturados (Tovar et al., 2005). Los ácidos grasos omega 3 y omega 6, son importantes precursores de prostaglandinas y tromboxanos, compuestos que participan en los procesos de inflamación y coagulación del organismo (Tovar, 2015) .

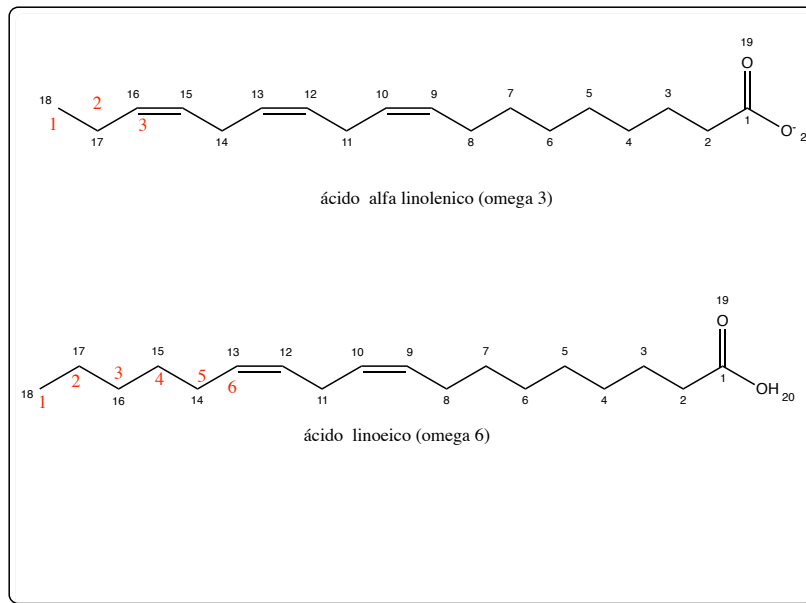


Figura 4. Forma de conteo para clasificar a los ácidos grasos insaturados como omega 3 y omega 6.

1.1.5 Ácidos grasos esenciales.

Como se indicó anteriormente, el organismo sintetiza por medio de la acido grasa sintasa como principal producto al ácido palmítico el cual contiene 16 carbonos. A partir de ese ácido graso por medio de una elongasa se sintetiza el ácido esteárico y posteriormente por medio de la estearoil-CoA desaturasa 1 se sintetiza el ácido oleico, el cual presente una doble ligadura entre el C-9 y C-10, por lo que los ácidos grasos más abundantes en los órganos de un mamífero incluyendo a los humanos son el ácido palmítico y el ácido oleico (Hodson L, 2009). La síntesis de los ácidos linoleico y alfa linolenico no puede ser sintetizados como se indicó anteriormente en el organismo debido a que el linoleico agrega una doble ligadura en el carbono 12 y no existe enzima en el organismo que pueda llevar acabo esta insaturación. De manera semejante para la síntesis del alfa linolenico se genera una doble ligadura entre el carbono C14 y C15, la cual tampoco puede ser generada en la célula. De esta manera estos

dos ácidos grasos se les denomina ácidos grasos esenciales, pues deben de consumirse a través de la dieta, siendo las principales fuentes los aceites de origen vegetales como el aceite de maíz, el aceite de soya o el aceite de chía entre otros (Díaz-Villaseñor, et al, 2013; Ooi et. al, 2015).

El ácido α -linolénico es un precursor de ácidos grasos omega 6 de cadenas superiores a 20 átomos de carbono y el ácido α -linolénico es un precursor de ácidos grasos omega 3, precursor de ácidos grasos de cadena superior a 20 átomos de carbono (Tovar et al., 2005; Leslie., 2015). A partir de los ácidos grasos esenciales, se pueden sintetizar moléculas mensajeras que participan en las cascadas de señalización, que intervienen en la activación de los procesos de inflamación, y en los procesos de coagulación, así mismo pueden ser usados como fuentes de energía cuando las reservas de ATP son deficientes. Entre estos ácidos grasos se encuentran el ácido araquidónico (Ara), el ácido docohexanoico (DHA) y el ácido eicosapentanoico (EPA) (Vázquez-Vela et al., 2008). El ácido araquidónico puede ser convertido a prostaglandinas (PGE), compuestos que son mediadores inflamatorios; o a prostaciclina (PGI₂), responsables de la dilatación de los vasos sanguíneos; o a tromboxanos (TX), responsables de la agregación de plaquetas. El ácido eicosapentanoico (EPA) produce prostanoides y leucotrienos, que se movilizan durante la respuesta anti-inflamatoria (Wiktorowska et al., 2015; Leslie et al., 2015; Nepelska., 2017; Ooi et al., 2015).

Además, estos ácidos grasos poliinsaturados esenciales mejoran la fluidez de la membrana celular; disminuyen los niveles de triglicéridos y colesterol-LDL. Por ello, los ácidos grasos esenciales son nutrientes importantes para el funcionamiento correcto del organismo (Kenedy et al., 2005; Rodríguez et al., 2017).

1.1.6 Ácidos grasos y efectos en la salud

Los ácidos grasos que no presentan dobles enlaces entre los átomos de carbono, son ácidos grasos saturados y están asociados al aumento de los niveles de triglicéridos en la sangre, así como al aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Rodríguez et al., 2017). Los individuos que presentan este estado suelen ser considerados como hiperlipidémicos o hipertrigliceridémico (Rodríguez et al 2017; Tovar et al., 2005).

Los ácidos grasos insaturados suelen disminuir los niveles de triglicéridos en la circulación cuando se consumen (Guilherme et al 2008). En estudios han encontrado que los ácidos grasos polinsaturados, entre ellos el ácido eicosanoico, el ácido linoleico y el ácido araquidónico pueden actuar como antagonistas de los procesos de inflamación, que se activan por el consumo desmesurado de ácidos grasos saturados(Leslie et al., 2015). El Instituto de Medicina de Estados Unidos (IOM, Institute of Medicine), así como la American Hearth Association (AHA) recomiendan el consumo de ácidos grasos polinsaturados como medida de prevención contra las enfermedades crónico-degenerativas. (Institute of medicine, 2017; American Hearth Association 2017).

1.1.7 Los ácidos grasos esenciales pueden regular procesos a nivel genético.

Las grasas que consumimos en los alimentos tienen diferentes funciones en el organismo. Se clasifican en ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. Su composición varía según el tipo de alimentos. En la tabla 1 se muestra la composición típica de dos alimentos, la carne de res y el aceite de soya, para comparar la composición de ácidos grasos saturados e insaturados que tienen cada uno de estos alimentos (Spiegelman,1996; Mohamed, 2012)

Los ácidos grasos polinsaturados son más abundantes en alimentos de origen vegetal como la soya mientras que los ácidos grasos saturados son más abundantes en los alimentos de origen animal, como la carne de res. En estudios se ha visto que los alimentos de origen animal aumentan el riesgo de contraer enfermedades crónico degenerativas debido a que se estimulan varias alteraciones metabólicas del organismo. Entre ellas la adipogénesis y el metabolismo de los lípidos (Spiegelman,1996; Azain et al, 2004).

Además pueden favorecer el desarrollo de hiperplasia e hipertrofia, dos estados patológicos que están asociados a la obesidad y sobrepeso cuya etiología es el consumo de ácidos grasos (Spiegelman, 1996; Jump et al, 1999).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de la carne y el aceite de olivo

	Alimentos de origen animal (res)	Alimentos de origen vegetal (soya)
Lípidos	% de cantidad total	% de cantidad total
Ácido mirística	1.6	0.13
Ácido palmítico	15.94	11.45
Ácido esteárico	8.29	3.85
Grasas saturadas	25.88	15.43
Ácido palmitoleico	3.44	0.22
Ácido oleico	18.44	18.78
Ácidos grasos monosaturados	21.89	19
Ácido linoleico	0.582	54.90
Gama linoleico	0.016	0
Ácido α – Linolénico	0.53	8.31
Ácido araquidónico	0.34	0
Ácido eicosapentanoico	0	0.24
Ácido docosahexapentanoico	0.001	0.13
Total de ácidos grasos poliinsaturados	1.48	63.58

(Torres et al, 2005; Carnevale et.al 2006)

1.1.8 Ácidos grasos y Diferenciación celular

Los ácidos grasos saturados (AGS) favorecen la maduración de los adipocitos en líneas celulares. En diversas líneas celulares como la línea celular 3TL3, un modelo de adipocito no maduro, se ha visto que los AGS pueden diferenciar a esta línea celular, transformando los preadipocitos a adipocitos blancos maduros. Los adipocitos blancos en su forma madura se encargan de absorber los ácidos grasos que circulan en la sangre y almacenarlos en forma de triglicéridos, siempre y cuando sean consumidos de manera adecuada (Spiegelman, 1996; Kubota et al 1999).

1.1.9 Mecanismo Molecular de Maduración de adipocitos blancos

A nivel genético el proceso de maduración de los adipocitos es regulado por el Receptor de peroxisoma-proliferador-activado-gamma (PPAR γ) que es un factor de transcripción versátil, que modula la transcripción de varios genes entre ellos, los de la maduración de los adipocitos. El proceso de maduración de adipocitos es conocido como adipogénesis. Los ácidos grasos saturados son agonistas del receptor PPAR γ (Spiegelman, 1996).

La unión de un ácido graso con PPAR γ provoca que este factor de transcripción se una con el receptor X retinoide(RXR) para formar un heterodímero e iniciar la transcripción de varios genes implicados en la adipogénesis, entre ellos los genes de diferenciación CEBPB, y SREBF1, que codifican a los factores de transcripción: a) proteína de unión al potenciador C/EBP (C/EBP) y b) a las proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides (SREBP1). Los factores de transcripción (C/EBP) y (SREBP1) activan la expresión de más enzimas de la adipogénesis, entre las que se encuentran la lipoproteína lipasa

(LPL), el transportador de glucosa 4 (GLUT4), la steroill-CoA desaturasa (SCDI) y la ácido graso sintasa (EAGS) (Spiegleman, 1996, Hassan 2012).

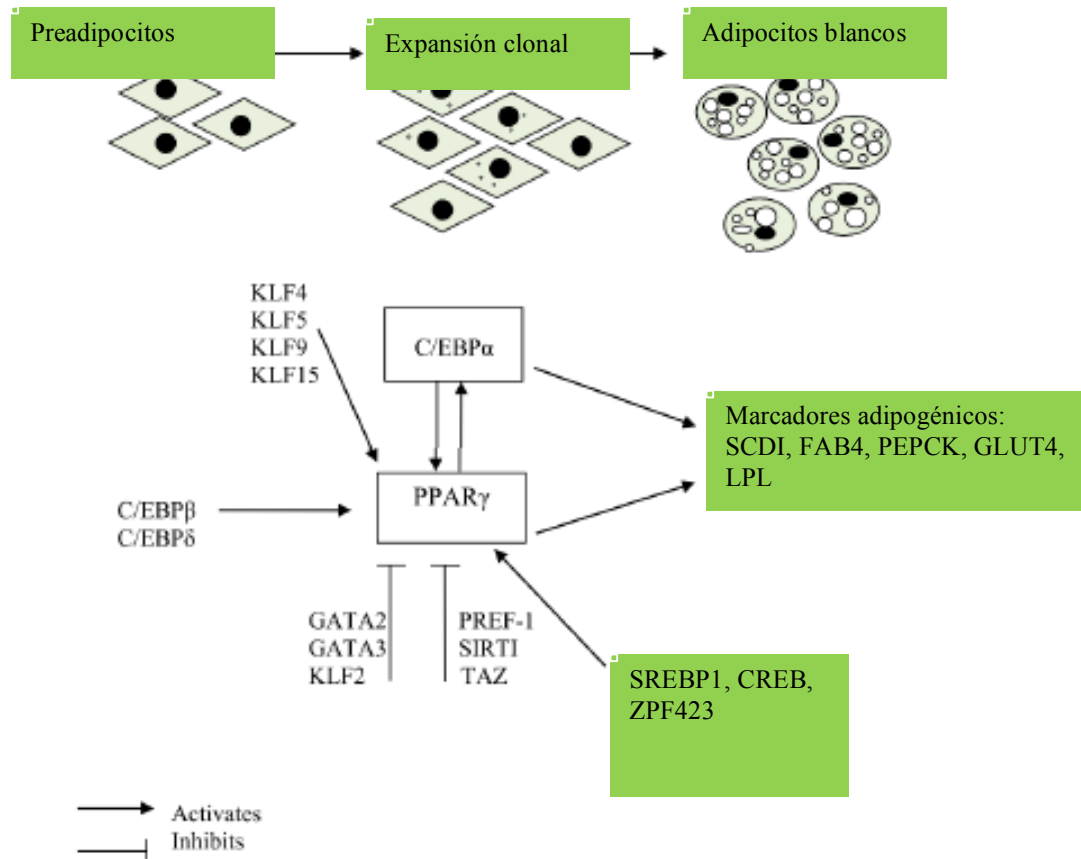


Figura5. Factores de transcripción involucrados y proteínas: (KLF's) Familia de factores tipo Krüppel, (PPAR γ) Receptor de peroxisoma-proliferador-activado-gamma, (C/EBP) proteína de unión al potenciador ccccaat , (SREBP-1) proteína de unión al elemento regulador esteroil, (ChREBP1) proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos, (Glut4) transportador de glucosa 4, (PREF-1) factor preadipocito, lipasa de lipoproteína, (FABP4) fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa, (SCDI) esteroil-CoA desaturasa, (CREB) elemento de respuesta de cAMP, (ZFP43) proteína de dedo de zinc. En esta figura se esquematiza como ocurre la regulación a nivel transcripcional del proceso de adipogenesis. Las flechas punteadas indican los factores que inducen el proceso de adipogenes mientras que la flechas planas indican los factores de trasncripción que lo inhiben. La familia de factores de trasncripción de Krüppel activan a PPAR γ para comenzar con la traducción de las proteínas SCD1, FAB4, PEPCK, GLUT4 Y LPL que a su vez están involucradas en esta diferenciación. Así mismo los factores de transcripción C/EBP, SREBP1, CREB y ZFP423 activan el proceso.

1.1.10 Salud y consumo de ácidos grasos.

Los ácidos grasos consumidos de manera crónica inducen primero un estado patológico conocido como hiperplasia. Cuya fisiopatología se caracteriza por el aumento de adipositos por un trastorno de la adipogénesis. Esto trae a consecuencia la ganancia de peso y acumulación de tejido adiposo visceral .

Si el consumo de estos ácidos grasos saturados continua, se genera un segundo estado crónico, la hipertrofia. La hipertrofia es un estado crónico cuya fisiopatología se caracteriza por el ensanchamiento anormal de adipocitos a causa de una acumulación excesiva de lípidos, en forma de triglicéridos, y secundario a esto se produce inflamación y resistencia a la insulina en el tejido adiposo.

La hiperplasia en conjunto con la hipertrofia son los responsables de los signos típicos de la obesidad. Esto es, resistencia a la insulina, niveles altos de triglicéridos y partículas VLDL (Spiegelman, 1996, Hassan 2012)..

1.1.11 Mecanismo molecular del proceso de hipertrofia.

El mecanismo molecular por el que ocurre la hipertrofia es por activación de PPAR γ a través de los AGS de forma alterada. A diferencia de la adipogénesis, en la hipertrofia, PPAR γ aumenta más los niveles de la enzima lipasa (LPL) con respecto a las demás enzimas, esto favorece la absorción de lípidos que viajan en la sangre en forma de partículas VLDL hacia el interior de los adipocitos por la actividad lipasa de estas enzimas. Lo cual favorece que haya más ácidos grasos disponibles y promueven la transcripción de más PPAR γ , lo que altera el proceso de adipogénesis por retroalimentación positiva,

aumentando la cantidad de adipocitos y la formación de tejido adiposo, así como aumento de obesidad (Madsen et.al,2004;Natarajan 2005) .

Los ácidos grasos insaturados (AGI), pueden revertir esta fisiopatología y disminuir la formación de tejido adiposo visceral, ya que actúan como antagonistas de los Ácidos grasos saturados (Zoubir et al, 1991). Los ácidos grasos insaturados que favorecen mayoritariamente esta disminución de tejido adiposo son los ácidos grasos polinsaturados $\Omega 3$ y los ácidos grasos $\Omega 6$ (Zoubir et al, 1991).

1.1.12 Mecanismo molecular de la inhibición del proceso de hipertrofia a nivel genético.

Los Ácidos Grasos Poliinsaturados inhiben la formación de tejido adiposo en el organismo por la desactivación del proceso de adipogénesis, mediante modificación covalente. La inhibición de adipogenesis se realiza mediante unas cinasas, cinasas de proteínas activadas por mitógeno” (MAPK, Mitogen activated protein Kinases,) que fosforilan a PPAR γ en el residuo de Serina 112, y provocan un cambio conformacional que impide a PPAR γ unirse a sus elementos de respuesta conocidos como PPARre (pparre), que están localizados en las regiones promotoras de los genes que están involucrados en este proceso de adipogenesis. entre ellos, los genes de las proteínas C/EBP1 y SREBP. Lo cual impide la maduración adipocitos y retarda parcialmente la formación de tejido adiposo visceral (Madsen et al 2004) .

EL estudio con ácidos grasos insaturados es aún un tema de investigación en vías de encontrar un ligando que antagonize los efectos PPAR γ en su totalidad.

Hasta el momento la información no es controversial debido a que se han presentado resultados controversiales, sobre los efectos producidos por los ácidos grasos polinsaturados. Estos efectos dependen de la longitud de la cadena, número de insaturaciones, la fuente de ácidos grasos, y la proporción de ácidos grasos saturados con respecto a los insaturados (Madsen et al 2004) .

1.2 Microbiota Intestinal

1.2.1 Aspectos generales

La microbiota intestinal es un conjunto de microorganismos comensales que habitan en el intestino grueso, y establecen una relación hospedero-microorganismo. Las bacterias han sido las más estudiadas (Fung et al., 2017). Mediante estudios de secuenciación masiva del gen ribosomal 16S, han encontrado que el colon está habitado aproximadamente por 100 trillones de bacterias, que ejercen diversas funciones en el organismo, entre ellas la degradación de oligosacáridos, la síntesis de vitaminas y la síntesis de bactericidas. Así mismo, protegen la integridad de la barrera intestinal. Es vital para la maduración del sistema inmunológico en el intestino. (Backhed et al., 2004; Holmes et al., 20012; Charbonneau et al., 2016; Turnbaurg et al., 2013).

La población de estos microorganismos aumenta progresivamente conforme se avanza de una región anatómica a otra. Desde el esófago hasta el recto, habitan aproximadamente de 10^3 a 10^8 bacterias, y en el intestino grueso se puede encontrar hasta 10^{11} bacterias. La diferencia en el tamaño de las poblaciones, se debe principalmente a que el flujo laminar es más rápido , a un pH menor y a la secreción de sustancias microbicidas como las sales biliares en el intestino delgado. Hasta el momento 1057 especies de bacterias han sido identificadas, de las cuales, 160 especies diferentes habitan en el colon de cada individuo y

estas especies no son equiparables entre un individuo y otro. (Weinstock, 2012; Hunt et al., 2013).

En estudios filogenéticos han encontrado que a nivel de filo, la microbiota está compuesta por 6 grupos principales: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, y *Verrucomicrobia* ((Koliada 2017; Holmes et al., 2012). Esta composición bacteriana depende de varios factores, tanto exógenos como endógenos, los exógenos la dieta, el uso de antibióticos, así también la higiene personal y la presencia de toxinas, mientras que en los factores endógenos se cuenta la genética. En un estudio realizado con ratones deficientes del gen de leptina (ob/ob) para estudiar el papel que juega la genética en la microbiota, se encontró que tuvieron los ratones deficientes de leptina presentaron un mayor abundancia de especies pertenecientes a la phyla de *Bacteroidetes*, en contraste con una disminución de *Firmicutes* (Koliada 2017).

La diversidad varía de un sitio anatómico a otro, en el estómago y el intestino delgado, hay mayor población de especies pertenecientes a la phyla de *Firmicutes* (*Lactobacillaceae*) y a las *Proteobacterias* (*Enterobacteriaceae*). Por otro lado, en el intestino grueso existen especies que pertenecen a los *Bacteroidetes* (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*), especies que pertenecen a los *Firmicutes* (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*) y especies que pertenecen a los *Verrucomicrobiales* (*Akkermansia muciniphila*). Esta diferencia está dada principalmente porque en el intestino delgado hay mayor cantidad de oxígeno y a que hay presencia de compuestos antimicrobianos en el intestino delgado (Walters, 2011).

1.2.2 Microbiota y alimentación

La microbiota del intestino grueso participa en la degradación de alimentos que que son difíciles de digerir, incluyendo particularmente hidratos de carbono

complejos, fibra soluble e insoluble, entre otros. La degradación por medio de la microbiota de estos compuestos genera ácidos grasos de cadena corta como son el acetato, el propionato y el butirato (Díaz-Villaseñor, 2016; Walters, 2011; Backhed et al., 2004; Wiktorowska et al., 2015), los cuales se ha demostrado que aportan alrededor de un 10% extra de energía a partir de los alimentos consumidos (Fava et al., 2006).

Los ácidos grasos de cadena corta son rápidamente absorbidos en el colon y utilizados por el huésped para diferentes funciones. Por ejemplo, el butirato se utiliza principalmente como fuente de energía para las células epiteliales del colon, y a dosis bajas, mejora la función de la barrera intestinal, y también regula la sensibilidad a la insulina (murina). En contraste, el acetato puede ser utilizado en la lipogénesis y el propionato en la gluconeogénesis hepática.

Además, la microbiota proporciona vitaminas tales como vitamina K, biotina, riboflavina (B2), cobalamina (B12) y posiblemente otras vitaminas del complejo B (Morowitz et al.; Aviv et al., 2016; Browne et al., 2017). Dependiendo el tipo de alimento que se consume se pueden favorecer especies que produzcan más butirato, en especial las que pertenecen a los *Firmicutes*. Esto puede favorecer la producción de precursores necesarios para la síntesis de ácidos grasos que pueden favorecer el proceso de adipogénesis.

1.2.3 Microbiota y respuesta inmunológica

El intestino es el área superficial más grande del organismo y por tanto es el nicho principal de la microbiota. (Honda et al., 2016; Blander et al., 2017; Mackos et al., 2017). Existen estudios en ratones libres de bacterias que señalan que la microbiota tiene influencia sobre el desarrollo de la respuesta

inmunológica (Blander et al., 2017; Takiishi et al., 2017; Fung et al., 2017). En un estudio hecho con un modelo animal en ratones libres de gérmenes se observó que los ratones tuvieron respuestas inmunológicas deficientes en comparación con aquellos que se colonizaron con bacterias. Estos animales presentaron nodos linfáticos pequeños y un número reducido de linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) así como citotóxicos ($CD8^+$). Esto hace evidente la intervención de la microbiota en los mecanismos de respuesta inmunológica. (Takiishi et al., 2017).

En otro estudio se evaluó la interrelación de la genética del organismo con la composición de la microbiota intestinal sobre sistema inmunológico utilizando ratones deficientes del receptor NOD32. Se encontró que hubo una disrupción de la barrera epitelial del intestino, aunado a un reducido número de linfocitos T cooperadores ($CD4^+$), lo que les confirió una menor respuesta inmunológica a bacterias patógenas (Zoete, 2013). Por lo que la microbiota actúa en conjunto con la genética del organismo (Mackos et al., 2017).

1.2.4 Microbiota y Obesidad

La microbiota intestinal en los últimos años ha sido considerada como un factor etiológico en el desarrollo de la obesidad. El consumo de una dieta elevada en grasa afecta la composición de la microbiota intestinal, principalmente disminuye las especies de *Bacteroidetes*, productoras de butirato (Fung et al., 2017). Este acontecimiento es conocido como disbiosis (Othman et al., 2016; Moreira, 2012). La disbiosis es un estado en el cual el equilibrio ecológico de las bacterias comensales que se establecen en el intestino se altera, en especial disminuyen las especies productoras de vitaminas y las que forman una barrera física contra las bacterias patógenas. Este estado alterado provoca que los mecanismos de respuesta inmunológica se activen y produzcan una respuesta inflamatoria que afecta la integridad del intestino. En especial, aumentan los niveles de expresión

de factores proinflamatorio como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y de la interleucina 1L- β . Además, se alteran los niveles de claudina, una proteína asociada con la permeabilidad intestinal. (Rial et al., 2016; Alcock et al., 2015; Gilbert et al., 2016; Lee et al., 2017).

Muchos grupos a nivel internacional trabajan descifrando el genoma de la microbiota. Las técnicas modernas de estudio de la microbiota nos han acercado al conocimiento de un número importante de bacterias que no son cultivables, y que tienen relación con algunas enfermedades. (Gilbert et al., 2016; Guinane et al., 2013).

1.2.5 Consumo de ácidos grasos y microbiota intestinal

La grasa es un nutrimento importante en la dieta de un individuo, se puede sintetizar en el organismo a partir de hidratos de carbono y/o algunos aminoácidos, particularmente la leucina (Araujo, 2017). Las grasas de la dieta varían mucho en su composición y su estructura, en especial, los ácidos grasos. Las grasas de origen animal como la manteca de cerdo, por lo general, contienen ácidos grasos saturados (AGS), pero el aceite de pescado, se compone de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI3) que son totalmente diferentes (Rasnick, 2018). Estudios previos han demostrado que el consumo de ácidos grasos saturados aumentan la permeabilidad intestinal, la resistencia a la insulina, y la adiposidad en el tejido adiposo blanco (Rasnick, 2018; Nagao et al., 2016)

El consumo de ácidos grasos en dietas altas en grasa (DAG) provoca un mayor flujo de quilomicrones que deterioran las funciones de la barrera intestinal si no

son removidos. Como consecuencia hay una disrupción de la barrera intestinal y un aumento de la permeabilidad del intestino. El posible mecanismo es por la acumulación excesiva de quilomicrones que generan un gradiente de presión sobre la pared intestinal. Uno de los factores asociados a estos cambios es la activación de la expresión de genes involucrados con la inflamación (Moreira, 2012; Sirisinha., 2017; Steimle et al., 2016; Strati et al., 2017). Como consecuencia hay un incremento en la sensibilización de los mastocitos. Los mastocitos bajo estas condiciones de estrés activan los mecanismos de inflamación a través de una respuesta inmunológica. En un estudio, realizado con modelos animales, usando ratones que alimentaron con una dieta al 40% de grasa saturada, se observó que los niveles de expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) α , interleucina 1 (IL-1), Interleucina 4 (IL-4), e Interleucina 13 (IL-13) aumentaron (Petar, 2017).

En otro estudio, utilizando ratones alimentados con una dieta alta en grasa como modelo de inflamación, se presentó una disminución de expresión de las proteínas claudinas y cadherinas, las cuales son necesarias para la formación de los desmosomas, que son vitales para mantener unidas las células epiteliales de la pared del intestino (Escobales, 2016).

Se ha demostrado que las grasas saturadas modifican la composición de la microbiota intestinal. Un individuo tiene una microbiota compuesta por cuatro phylas bacterianas principales: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Wisnewsky et al., 2014). El porcentaje de estos grupos varía, pero generalmente está compuesto por 45 % de Bacteroidetes, 45 % de *Firmicutes* y 10% de las filas restantes (Koliada, 2017). Una dieta alta en grasa saturada perturba esta composición y favorece que disminuyan las poblaciones de cepas comensales, en especial las productoras de butirato.

En el estudio de Tariq y colaboradores se administró una dieta al 40% en grasa saturada a ratones C56BL6 durante 5 semanas. Se observó un cambio en la composición microbiana, incrementando la población de *Bacteroidetes* de 50.4% a 54.66% y disminuyendo la población de *Firmicutes* de un 44% a un 41%. Sin embargo, en otro estudio se observó que el consumo de una dieta alta en grasa produjo un efecto contrario, disminuyendo las especies de *Bacteroidetes* y aumentando las especies de *Firmicutes* (Tariq, 2018).

Hallazgos posteriores utilizando ratones alimentados con grasas saturada en la dieta, mostraron cambios similares en la composición de la microbiota asociados con la presencia de inflamación intestinal. El cambio de la composición estuvo representado por una mayor abundancia de bacterias gram-negativas, que indujeron la translocación de la endotoxina LPS (lipopolisacárido) del lumen al interior de la barrera epitelial. Esto provocó la activación de los receptores TLR4, que son receptores localizados en los enterocitos, y al reconocer este tipo de moléculas se activó la cascada de señalización que promueve la expresión de las citocinas proinflamatorias como IL-6 y el $TNF\alpha$. Estas citocinas proinflamatorias se presentan en pacientes con enfermedades como el síndrome del intestino irritable y la obesidad (Nicole et al., 2012; Cairtona et al., 2013; Lee et al., 2017; Cheng et al., 2017). Al parecer los alimentos y la microbiota intestinal pueden en conjunto exacerbar el desarrollo de ciertas enfermedades que tienen como sintomatología la activación de la respuesta inflamatoria (Nicole et al 2012; Yang et al., 2017).

En estudios llevados a cabo por Nicole de Wit y colaboradores, se analizaron los efectos metabólicos y los cambios de la microbiota intestinal de acuerdo con el consumo de diferentes aceites que tenían un diferente grado de insaturación. Los aceites que emplearon fueron el aceite de palma, aceite de olivo y aceite de cártamo cuya proporción de ácidos grasos saturados e insaturados (s:i) fue: Aceite de palma (1:1), aceite de oliva (2:8) y aceite de cártamo(1:9). El aceite de

palma por ser el más saturado indujo mayores cambios en la composición de la microbiota intestinal. Promovió que hubiera una menor diversidad bacteriana a cambio de un aumento de *Firmicutes*, en especial de las especies *Clostridium IV* y *Clostridium VI*. Además, se observó una mayor ganancia de peso en los ratones, una mayor resistencia a la insulina y mayores niveles de triglicéridos (Nicole et al., 2012). Esto sugiere una asociación entre la microbiota intestinal, la ganancia de peso y el consumo de ácidos grasos saturados (Nicole et al., 2012).

Además, los ácidos grasos saturados están asociados a una mayor ganancia de adiposidad en el tejido adiposo blanco y de inflamación, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados se asocian con menor inflamación y promueven un fenotipo metabólicamente más saludable. Por lo tanto, la dieta tiene un gran impacto en la composición microbiana del intestino (Scott et al., 2013), en las propiedades inflamatorias del organismo y en la capacidad metabólica de las bacterias que conforman la microbiota intestinal (Tremaroli y Backhed, 2012; Dias et al., 2017).

Estos efectos han sido más notorios en ratones libres de gérmenes, que han mostrado más resistencia a la obesidad inducida por dieta, y una reducción en la inflamación del tejido adiposo así como una menor resistencia a la insulina (Backhed et al., 2007; Caesar et al., 2012; Ding et al., 2010; Rabot et al., 2010; Wong et al., 2017). Esto sugiere que estos factores microbianos pueden contribuir directamente a la inflamación del tejido adiposo blanco y a su vez, en el desarrollo de hiperplasia e hipertrofia, figura 3.

De hecho, se ha mostrado que los cambios en la microbiota intestinal pueden aumentar el riesgo de una persona al desarrollo de ciertas enfermedades, entre ellas el síndrome del intestino irritable, la obesidad, el autismo y el cáncer (Cao et al., 2017; Kraneveld., 2016; Lee et al., 2017; Rajagopala et al., 2017; Strati et al., 2011; Sutu et al., 2015).

Microbiota Intestinal

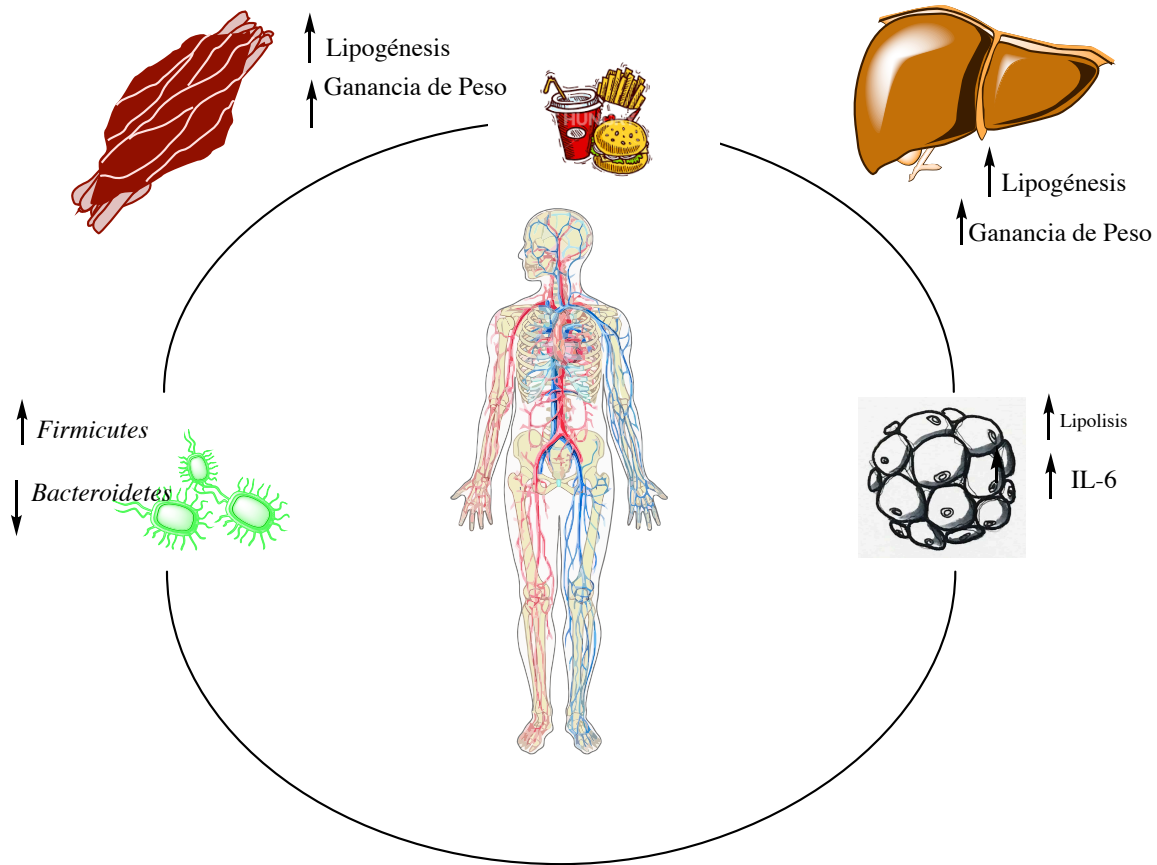


Figura 6. Interacción de la microbiota intestinal, alimentos y tejido adiposo visceral

1.2.6 Microbiota y captación de Energía de los Alimentos

La microbiota puede aumentar la captación de energía de los alimentos en el intestino. En un estudio, donde se usaron ratones de la cepa C56BL6 libres de gérmenes que fueron tratados con una mezcla de antibióticos de amplio espectro, se observó un aumento de los *Firmicutes* y una disminución de los

Bacteroidetes. Esto promovió no solo un cambio en la función metabólica de la microbiota sino que alteró la capacidad metabólica del intestino de captar energía de los alimentos. Entre los cambios encontrados fueron un aumento en la expresión de enzimas fosfotransferasas y enzimas del sistema de transporte ABC, que promueven una mayor absorción de alimentos. Como consecuencia, se observó un incremento en la ganancia de peso y de adiposidad (Weinstock,2012).

1.3 Aceite de soya

Se conoce que los aceites de origen vegetal incluyendo el aceite de soya tienen un contenido importante de ácidos grasos poliinsaturados. Dentro de estos, el aceite de soya se caracteriza por tener ácidos grasos omega 3 y omega 6. Análisis por cromatografía de gases muestran que el aceite de soya tiene un 15% de ácidos grasos saturados (13.1% de ácido palmítico y 4.9% de esteárico), 24% de ácidos grasos monoinsaturados (22.2% ácido oleico y 0.18% ácido palmitoleico) y 61% de ácidos poliinsaturados (52.1% ácido linoleico que es precursor de los ácidos grasos omega 6 y un 6.2% de ácido alfa-linolénico, que es precursor de los ácidos grasos omega 3). Lo que lo convierte en un aceite ideal para estudiar los efectos que pueden producir los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6 en combinación con los ácidos grasos saturados (Torres et al 2006). En la tabla 2 se muestran su contenido de grasas saturadas, monoinsaturadas y polinsaturadas.

Tabla 2. **Composición de Ácidos Grasos del Aceite de Soya**

Tipo de Ácido Graso	Porcentaje %
Grasa saturada (GS)	
Ácido Butírico	0.13
Ácido Laurico	0.08
Ácido Mirístico	0.13
Ácido Palmítico	11.45
Ácido Estearico	3.85
Ácido Araquidónico	0.67
Suma	16.31
Grasa Monoinsaturada (GM)	
Ácido Palmitoleico	0.22
Ácido oleico	18.78
Ácido Vaccenico	1.19
Suma	20.19
Grasa poliinsaturada	
Ácido Linoleico	54.90
Ácido α - linoléico	8.31
Ácido Aracadonico	-
Ácido Eicosapentanoico	-
Ácido Docohexapentanoico	-
Suma	63.58

(Torres et al 2006)

1.4 TEJIDO ADIPOSO

1.4.1 Tejido adiposo blanco y pardo

El tejido adiposo es un tejido conectivo caracterizado por almacenar energía en forma de triglicéridos. Esta compuesto de adipocitos y células estromales vasculares entre las que se incluyen leucocitos, macrófagos y

fibroblastos. Existen dos tipos de tejido adiposo, el blanco y el pardo, cuyas funciones son totalmente diferentes. Por una parte, el tejido adiposo blanco se encarga de almacenar energía química en forma de triglicéridos para luego enviarlos en forma de ácidos grasos a órganos periféricos para la obtención de energía cuando los periodos de ayuno son largos (Bartelt et.al , 2013).

El tejido adiposo pardo es un órgano diferente que funciona como aislante térmico en condiciones de temperatura extremadamente bajas. Esto ocurre a través de la β oxidación con la proteína UCP-1 como agente desacoplante y mediante el elevado número mitocondrial que poseen. La grasa parda también se conoce como grasa multilocular debido a que en el citosol de este tipo de células los niveles de grasa son más bajos y hace que las vesículas de grasa sean menos abundantes y más pequeñas (Bartelt et.al,2013; Kusminki et.al,2016).

1.4.2 Morfología del tejido adiposo

La morfología de estos tejidos se distingue por varias características. El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos de color blanco, debido a que tienen un número bajo de mitocondrias y a que están menos irrigadas por vasos sanguíneos. Tienen una vesícula lipídica grande de triglicéridos y un núcleo que se encuentra localizado contra la membrana plasmática (Bartelt et.al , 2013).

Por otra parte el tejido adiposo café tiene este color debido a que está compuesto por adipocitos que tienen un elevado número de mitocondrias y esta ampliamente irrigado por vasos sanguíneos. En estas células el núcleo se encuentra más proximal al centro debido a que los lípidos se encuentran almacenados en vesículas pequeños (Bartelt et.al , 2013).

Los adipocitos de ambos tejidos están inervados por nervios simpáticos que controlan mediante regulación hormonal los procesos fisiológicos de los dos tipos de tejido adiposo (Bartelt et.al , 2013).

1.4.3 Funciones del tejido adiposo blanco

Este órgano no sólo almacena energía, sino que también secreta hormonas o adipocinas y citocinas. Una de estas hormonas es la leptina la cual esta asociada con el proceso de saciedad. Deficiencia en el receptor de esta hormona provocan que exista un ingestión elevada de alimentos y por lo tanto una acumulación de energía, que se almacena en forma de grasa. Cuando se supera la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo se presenta la hiperplasia e hipertrofia, que conducen a un aumento en el número y tamaño de los adipocitos. Esto provoca la liberación de citocinas proinflamatorias, entra ellas las interleucinas IL-6, IL- β , IL- 4 y IL-11 (Bartelt et.al ; Kusminki et.al,2016).

Otra de las hormonas liberadas por este tejido secretor es la adiponectina. Esta hormona modula la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa. Los niveles de esta hormona se elevan a través de la estimulación del receptor nuclear PPAR γ , y se ha encontrado que en sujetos que presentan obesidad, los niveles de adiponectina son más bajos. Esto explica parcialmente la resistencia a la insulina, que es una alteración típica en individuos con sobrepeso (Kusminki et.al,2016).

1.4.4 Localización de tejido adiposo blanco y pardo

Las regiones anatómicas donde se localiza el tejido adiposo son en las regiones interescapulares, en las regiones gonadales, en las inguinales, en las regiones surpraclaviculares y en las regiones nucales, las cuales conforman al tejido adiposo subcutáneo, el cual no se considera peligroso. Sin embargo, existe tejido adiposo en otras partes del organismo que se conoce como tejido adiposo visceral. Este tejido adiposo se caracteriza por estar más cercano a los órganos, en especial el páncreas, el hígado y el corazón. La acumulación excesiva de tejido adiposo visceral provoca inflamación y aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas (Bartelt et.al , 2013).


1.4.5 Apardamiento del Tejido Blanco

El tejido adiposo blanco posee adipocitos que tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos pardos, proceso conocido como apardamiento o browning. Este proceso mejora el gasto energético, la sensibilidad a la insulina y aumenta la lipólisis. Por lo que su estimulación atenúa las alteraciones metabólicas producidas por la ganancia de adiposidad (Bartelt et.al , 2013).

1.4.6 Mecanismo molecular

El proceso de apardamiento es activado mediante el incremento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que es una señal química que actúa de mensajero intracelular y activa las cinasas PKA y AMPK que fosforilan al factor de transcripción ATF-2. Este factor de transcripción ATF-2 activa la traducción de las proteínas PPAR γ y PGC1 α , reguladores del proceso de diferenciación y se unen a la región promotora de los genes involucrados en el

proceso de apardeamiento, entre ellos los genes HOXC9, CITED1, TMEM26, Tnfrsf9, PRDM16 y UCP-1 para activar su transcripción. Este proceso ocurre por retroalimentación positiva, esto es, una vez que es activada la transcripción de PPAR γ , se activa la expresión genética de los demás genes necesarios del proceso de apardeamiento. (Bartelt et.al , 2013).

Los niveles de (AMPc) aumentan mediante regulación hormonal a través de los receptores  adrenérgicos. El aumento ocurre por señalización química vía catecolaminas o proteínas morfogénicas óseas, las cuales se unen a sus receptores e incrementan los niveles de (AMPc) (Bartelt et.al, 2013).

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha demostrado que varios compuestos bioactivos pueden modificar la microbiota. Estudios por Gordon y colaboradores mostraron que inicialmente la proporción de las principales *phylas* de bacterias de la microbiota intestinal, que se define como la comunidad bacteriana que habita el intestino, se asocian o no con el desarrollo de obesidad. Así un aumento de *Firmicutes* y una disminución de los *Bacteroidetes*, que son las principales *phylas* de las microbiota se asocian con el desarrollo de obesidad. Estudios recientes han mostrado que el incremento específico de ciertas especies bacterianas como la *Akkermancia muciniphila*, mejoran la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente se ha sugerido, pero aún no se ha establecido, que la presencia de algunas especies bacterianas pudieran influir de alguna manera en el proceso del apardeamiento del tejido adiposo (Alcock, 2015).

Por otra parte, no se ha estudiado la relación entre el consumo de los ácidos grasos polinsaturados, particularmente del aceite de soya, sobre posibles

cambios en la microbiota intestinal. Por ello, es de gran interés estudiar los posibles mecanismos que pudieran subyacer en esta interacción. Por ejemplo, en un estudio se observó que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados modificó la composición de la microbiota y a su vez este efecto mejoró la salud mental de individuos con depresión o ansiedad (Pusceddu et al., 2015; Leslie et al., 2015; Alcock et al., 2015).

Hipótesis

El consumo de una concentración elevada de aceite de soya (21% de la dieta), incrementará la ganancia de peso y la grasa corporal por una disminución en la capacidad de apardeamiento del tejido adiposo blanco y una disbiosis de la microbiota intestinal en comparación con ratones que consumen una dieta con un requerimiento adecuado de aceite de soya (7% de la dieta).

Objetivo general

Evaluar la respuesta sobre la ganancia de peso, composición de la microbiota intestinal y el proceso de apardeamiento en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (aceite de soya al 21%) con respecto a ratas alimentadas con una dieta que contiene el requerimiento de grasa (aceite de soya al 7%).

Objetivos específicos

1. Evaluar quincenalmente la composición corporal de ratones alimentados con la dosis recomendable (7%); aproximadamente 4kcal/g de dieta y tres veces la dosis (21%); aproximadamente 5 kcal/g de aceite dietario y hacer una comparación entre ellas.

2. Comparar el gasto energético y el cociente respiratorio de los dos grupos de ratones.
3. Estudiar la resistencia a la insulina por medio de una curva de tolerancia a la glucosa y una prueba de sensibilidad a la insulina.
4. Cuantificar en suero, al finalizar el estudio, las siguientes variables bioquímicas: glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL.
5. Estudiar en el tejido adiposo blanco, la expresión génica de marcadores de termogénesis y de apardeamiento: UCP1, PPAR1 γ , PRDM16 y PGC1 α .
6. Realizar estudios histomorfológicos de tejido adiposo pardo y blanco.
7. Evaluar la composición de la microbiota intestinal en ratones C57BL6 alimentados con dieta que contenga aceite de soya al 7% o al 21% mediante la secuenciación del gen rRNA 16S ribosomal, utilizando la plataforma MiSeq de Illumina.

Metodología

Animales

Se trabajó con 14 ratones machos de la cepa C57BL6 (C57BL/6) con una edad de 7 a 9 semanas, con un peso promedio de 22.9 ± 0.5 g que se alimentaron usando una dieta estándar (AIN93) o con una dieta modificada de AIN93 alta en grasa (AIN93-S). La fuente de grasa provino del aceite de soya, usando una proporción de 7% para la AIN93 y 21% para la AIN93-S.

Los ratones fueron alojados en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, con ciclos de 12 h luz y 12 horas de oscuridad teniendo libre acceso a comida y agua.

Dietas

Para la alimentación de los roedores se usaron dos dietas diferentes; una control con una relación de grasa/carbohidratos (7/61) y una dieta alta en grasa con una relación (21/47). A continuación, se describe en la Tabla 3 cada uno de los componentes usados en las dietas.

Tabla 3. Pesos de los componentes usados en las dietas

Ingredientes	AIN93 (g/Kg)	HFD g (g/Kg)
Caseína	220	220
Sacarosa	100	100
Almidón de maíz	367	263
Dextrosa	132	96
Fuente de grasa	70	210
Mezcla de vitaminas	10	10
Celulosa	50	50
Mezcla de Minerales	50	50
Citrato de Colina	1.7	1.7
Tert-butylhidroquinona(TBQH)	0.014	0.014

Las dietas suministradas a los animales se basaron en las guías para estudios nutricionales en roedores del “American Institute of Nutrition Rodent Diets”. Además, las dietas son flexibles a un rango amplio de modificaciones. La dieta que se conoce como AIN93 fue usada para elaborar la dieta del grupo control. La dieta experimental se realizó modificando el contenido de carbohidratos, a través de modificar la cantidad de almidón de maíz y dextrosa. Adicionalmente se agrega en la Tabla 4 tabla en porcentaje el contenido de macronutrientes expresado en kilocalorías.

Tabla 4. Porcentaje kilocalórico de los macronutrientes.

Macronutrientes Usados	AIN93 % de Kilocalorías	HFD % de Kilocalorías
Carbohidratos	60%	40%
Protéínas	22%	19%
Grasas	18%	41%
Total	100	100%

División de Grupos

Para realizar el estudio fueron formados dos grupos de 7 ratones, a partir de una población de 14. El primer grupo fue alimentado con una dieta con aceite de soya al 7% y los nutrimentos que son enunciados en la Tabla 1. Este grupo fue usado como grupo control. El segundo fue alimentado con una dieta con aceite de soya al 21%. El periodo que duró el tratamiento fue de 3 meses con comida y agua sin restricción de horario.

Pruebas Bioquímicas

En ratones, la determinación en suero de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL y -LDL se realizó utilizando el analizador químico automatizado cobas 111 C (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Alemania). La concentración de insulina se determinó usando un kit de ensayo por inmuno absorción ligado a enzima (ELISA) para insulina (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA). Los análisis se realizaron usando las especificaciones del fabricante.

Análisis de sensibilidad a la Insulina y de tolerancia a la glucosa

Al final del periodo de los 3 meses se realizaron pruebas de sensibilidad a la insulina y de tolerancia a la glucosa (GTC) a los ratones alimentados con las dietas. Brevemente, los ratones se dejaron en ayuno de 6 horas y se administró 0.5 UI Insulina/Kg o de D-glucosa por vía intraperitoneal a una concentración de 2g/Kg y se tomó una muestra de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración, por venopunción de un corte superficial de los vasos de la cola, y los niveles de glucosa se midieron utilizando un glucómetro (FreeStyle, Abbott, CA, USA).

Gasto energético

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

Extracción de RNA

Para la extracción de mRNA se tomaron 100mg de tejido adiposo blanco y se homogenizó en el equipo Tissue Lyzer. Se extrajo el RNA total de las muestras de tejido adiposo blanco utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). La pastilla de RNA se resuspendió en 15 μ l de agua estéril y se evaluó su concentración y pureza a 260nm. Se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando la enzima

transcriptasa inversa M-MLV y oligo (dT) 12-18 como cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Cuantificación relativa de PCR en tiempo real

El nivel de expresión relativa para cada gen se determinó usando un triplicado de 12 ng de cDNA y el par de oligonucleótidos por cada gen obtenidos de Sigma Aldrich Company. Para la evaluar la abundancia de la concentración de un mRNA específico se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés utilizando el fluoróforo SYBR Green que es una cianina asimétrica el cual se une a las moléculas de ADN de doble cadena mediante la intercalación entre las bases de ADN. En la PCR cuantitativa, la amplificación del ADN se monitorea en cada ciclo de PCR. Cuando el ADN se encuentra en la fase lineal del registro de la amplificación, la cantidad de fluorescencia obtenida con el equipo aumenta por encima del fondo. De esta manera se puede determinar, de forma relativa o absoluta, cuánto ADN ha sido amplificado. Las mediciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos ópticos utilizando el equipo Light Cycler 480 Multi Well 96/34 (Roche Applied Science Menheim, Germany). Se usó el gen m36b4 como gen estructural. La secuencia de oligonucleótidos sentido y anti sentido se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores empleados.

Gen	Secuencia sentido o forward	Secuencia anti sentido o reverse
PGC1 α	5'-AAGTGTGGAAGCTCTCTGG-AACTG-3'	5'-GGGTTATCTTGGTTGGCT-TTATG-3'
PPAR- γ 1	5'-CGAGTCTGTGGGGATAAA-GC-3'	5'-CCAACAGCTTCTCCTTCT-CG-3'
UCP-1	5'-CTTTGCCTCACTCAGGAT-TGG-3'	5'-ACTGCCACACCTCCAGGTC-ATC-3'
M36B4	5'AGATTCGCGGATATGCTGCTGTTGG-3'	5'-AAAGCCTGGAAGAAGGAGGRC-3'

El esquema de amplificación de la PCR fue de un ciclo a 50°C durante dos minutos y 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de 94°C por 15 segundos seguido por 60°C durante 1 minuto. La expresión relativa se calculó en base a la eficiencia $E = 10^{-[1/\text{pendiente}]}$ de los oligos y los valores del ciclo umbral (CT) de los grupos alimentados con aceite de soya al 7% (control biológico) con respecto a los grupos alimentados con las diferentes dietas experimentales, y posteriormente se comparó con las del gen de referencia m36b4 basado en la siguiente ecuación.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E \text{ Gen de Interés})^{\Delta Ct1(\text{control-muestra})}}{(E \text{ gen de referencia})^{\Delta Ct2(\text{control-muestra})}}$$

Secuenciamiento del gen 16 S ribosomal

Para la extracción del DNA del gen ribosomal 16S se usó el kit de extracción de RNA mini kit extraction kit, debido a que es el recomendado por el protocolo de Illumina. Después de haber extraído el DNA, se verificó con el Nanodrop la relación DNA/Proteína para detectar el grado de la purificación. Posteriormente se verificó la integridad del ADN mediante una electroforesis en agarosa y se llevo a cabo la construcción de bibliotecas de DNA.

Se utilizó la plataforma MiSeq para la secuenciación de las muestras obtenidas, esta plataforma se basa en la secuenciación por síntesis, y luego se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S, utilizando cebadores para aquellas regiones que contenían también un adaptador especificado por Illumina:

(F:5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3'yR:5'GTCTCGTGGGCTCGGAGTGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacciones de PCR con un volumen total de 25 µl, de los cuales 2.5 µl eran ADN genómico (5 ng / µl en Tris 10 mM, pH 8,5), 12.5 µl de ADN polimerasa de Alta Fidelidad 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 µl de cada cebador (1 µM). Esta mezcla se colocó en el termociclador utilizando el siguiente programa: 3 min a 95 ° C, seguido de 25 ciclos de amplificación que consistían en desnaturalización (30s a 95 ° C), alineación (30s a 55 ° C) y extensión (30s a 72 ° C). La extensión final consistió en 5 minutos a 72°C. Los amplicones se purificaron usando perlas AMPure XP y su tamaño se verificó en electroforesis capilar en el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.), con un tamaño aproximado de 550 pb. Una vez pasado el control de calidad, las muestras fueron indexadas usando el Illumina Nextera XT Index Kit (v.2, Set A). Para este proceso se tomaron 5 µl del primer producto de PCR, 25 µl de ADN

polimerasa de Alta Fidelidad 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 µl de cada cebador (Índice), teniendo un volumen total de 50 µl que se mezclaron y se devolvieron al termociclador, utilizando las siguientes condiciones: 3 minutos a 95 ° C, seguido de 8 ciclos de amplificación que consistieron en desnaturalización (30s a 95 ° C), alineación (30s a 55 ° C) y extensión (30s a 72 ° C). La extensión final consistió en 5 minutos a 72°C. Este producto se purificó y se analizó su integridad como se ha indicado anteriormente; los amplicones tenían un tamaño aproximado de 610 pb. La concentración de ADN bicatenario se determinó por fluorometría (Qubit fluorometer 3,0, kit de alta sensibilidad). La biblioteca final se mezcló equimolarmente y se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq (MiSeq Reagent Kit V.3, 600 ciclos) siguiendo las instrucciones del proveedor, generando lecturas de 300 bases en cada dirección. Finalmente, los datos obtenidos se analizaron utilizando QIIME (Versión 1.9).

Siguiendo el protocolo de Mi-SEQ de illumina, se realizó la secuenciación masiva de los Filums presentes en las muestras. Con el programa QUIIME se analizó la composición de la microbiota a diferentes niveles taxonómicos.

PCR de los Filum de la microbiota

Para poder realizar los PCR de los Filum de Bacteroidetes, Prevotella y Lactobacillus, primero se extrajo DNA de las heces de los ratones del grupo control y experimental. Para la extracción y purificación de DNA, se pesaron 200g de heces, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.6 ml y se agregaron 1.6 ml de buffer ASL. Se centrifugó durante 1 min a 13500 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.6 ml. Se agregó una pastilla especial que tiene el kit de extracción y que remueve impurezas restantes en la muestra. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a 18500 x g. En un tubo aparte se

pusieron 600 µl de buffer Al y 25 µl de proteinasa K y al final se agregó 600 µl de la muestra. Después este tubo se calentó a 70°C y se agregó etanol en frío. Se pasó esta solución a unos tubos con filtro de sílice y se agregó 500 µl de buffer Aw1, se centrifugó durante 1 min a 18500 x g y se agregó después 500 µl de buffer Aw2. Se centrifugó durante 3 min y se agregó finalmente buffer AE para obtener el DNA purificado.

Luego se pasó a cuantificar la abundancia relativa de cada Filum por PCR. Para hacerlo se estandarizó la concentración de DNA a 60 ng/ml. Posteriormente se preparó la muestra para medición adicionando lo siguiente: en una placa de 96 pozos se agregaron 3 µl de SYBR Green, 2 µl de cDNA, 1 µl de oligonucleótidos y 4 µl de H₂O. Los oligos que se usaron están en la tabla 6 así como las condiciones usadas.

Tabla6. Cebadores utilizados en los estudios de PCR

Filums tipo	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tm
Bacteroidetes	5'-AACGCTAGCTACAGGCTT-3'	5'ACGCTACTTGGCTGGTTCA-3'	62
Lactobacillus	5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	67
Prevotella	5'-CACCAAGGCGACGATCA-3'	5'-GGATAACGCCYGGACCT-3'	67
Universal	5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3'	5'-TACGGCTACCTTGTTACG-3'	62

Histologías

Para conocer los cambios morfológicos en los tejidos estudiados, se llevaron a cabo una serie de estudios histológicos en tejidos adiposos blanco. Con esta finalidad se realizó la tinción de hematoxilina-eosina en estos tejidos, para lo cual se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Se tomaron segmentos de tejido adiposo blanco y se fijaron en formol-fosfato, para después incluirlos en bloques de parafina, para ello las muestras se

deshidrataron en baños sucesivos de soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico de la siguiente manera:

- 1) Alcohol etílico al 70%, 12 horas
- 2) Alcohol etílico al 70%, 12 horas
- 3) Alcohol etílico al 95%, 1 hora
- 4) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1 hora
- 5) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1.5 hora

Una vez que las muestras se estaban totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto, se procedió a la diafanización ya que la parafina no es soluble en alcohol. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes. El procedimiento de diafanización se realizó de la siguiente manera:

- 1) Alcohol absoluto 50% - xilol 50%, 1 hora
- 2) Xilol, 1 hora
- 3) Xilol, 1 hora

Para poder realizar los cortes, las muestras se incluyeron en parafina, para lo cual la parafina se disolvió usando una estufa y se colocaron en 3 recipientes, el primero recibió las muestras embebidas en xilol. El último de los recipientes contenía a las muestras antes del proceso de formación de los “bloques” de parafina, los tiempos de este proceso fueron: primer baño 1.5h, segundo baño 1h y tercer baño 30 min. La inclusión de parafina se efectuó empleando moldes de metal, con orientación de las muestras adecuada, para facilitar los cortes. Para la inclusión el molde elegido se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido del tercer recipiente y se orientó una de sus se sumergió al interior del molde, una vez que la

parafina empezó a solidificarse los moldes se enfriaron de inmediato para que la parafina se solidificara de manera homogénea.

Una vez obtenidos los bloques de parafina, se realizaron cortes con un grosor de 6 micras para tejido adiposo de manera seriada. Las secciones se extendieron y se recogieron al adherirse al portaobjetos. Sobre dichas laminillas se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina. Los cortes se tiñeron primeramente con una solución de hematoxilina durante 8 minutos. Luego se hicieron cuatro lavados con agua de grifo. Después, se hizo un lavado con PBS 1x durante 1 minuto. Más adelante se hizo un lavado por triplicado con agua destilada. Finalmente se hizo una tinción con eosina durante 1 minuto. Posteriormente se realizó una deshidratación que comenzó con 2 lavados de alcohol al 96%. Después se hicieron 2 cambios de etanol 100% durante 1 minuto. Luego se hicieron 2 cambios en xilol y finalmente se usó la solución de epóxido para colocar el cubreobjetos.

Finalmente se montaron y observaron al microscopio (Leica DM750 Wetzlar, Alemania), los cortes fueron fotografiados con una cámara digital (Leica DMC2900, Wetzlar, Alemania), y se procesaron con el software de imágenes Leica LAS Core V4.5.

Análisis de cuantificación de proteínas por western blot.

Se realizó el análisis por Western Blot para la determinación del contenido de proteína de UCP1 en tejido adiposo blanco. Para hacer la extracción de proteína se utilizó el amortiguador RIPA debido a que es adecuado para hacer la extracción de proteínas mitocondriales. Se agregaron 10 ml de amortiguador RIPA sin activar en un vaso de precipitado y se le agregó una pastilla de inhibidores de proteasas y 100 µl de fluoruro de sodio. Finalmente se agregaron 200 µl del Vanadato de sodio. Después, se pasó a triturar el tejido en un equipo

de Tissue Lyser, con las siguientes condiciones: 30.0 s^{-1} durante 1 minuto. Luego se agregaron 500 μl de buffer de lisis. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C . Se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf de 1.6 ml. Se homogeneizó con vortex y se almacenó en alícuotas de 100 μl a -70°C . Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Para realizar el análisis de western blot, se utilizaron 30 μg de proteína, los cuales se corrieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras se prepararon previamente con amortiguador de carga que contenía beta-mercaptoetanol y amortiguador de LAEMMLI 2X. Las muestras se calentaron a 80°C durante 5 minutos y posteriormente se cargaron en el gel junto con el marcador de peso molecular y la electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 2:00 h. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF con un equipo transblot a 100 V durante 20 minutos. Se corroboró la transferencia con el colorante de rojo Ponceu. Posteriormente se bloquearon las membranas de PVDF con leche en polvo a una concentración del 5% disuelta en TBS-Tween. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti ucp-1 de conejo (1:1000) obtenido de abcam (155157). Se volvió a lavar la membrana tres veces con TBS-Tween y se incubó con un anticuerpo secundario de conejo (1:3000). Posteriormente se lavó tres veces la membrana y se aplicó la solución sustrato immobilon quimiolumincente de HRP de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para la documentación de las imágenes se utilizó el fotodocumentador Chemidoc TM MP SYSTEM de Biorad. La densitometría se realizó con el programa Image j®.

Análisis estadístico

Los resultados se reportan como promedio \pm error estándar de la media. Para realizar las comparaciones entre los grupos se realizó una prueba de t-student

de dos colas en donde se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0.05$

RESULTADOS

Ganancia de peso e ingesta energética.

Lo primero que se evaluó fueron los cambios en la ganancia de peso de los ratones alimentados con las dos dietas experimentales. Los dos grupos experimentales iniciaron con el mismo peso que era de aproximadamente 22 g. Como era de esperarse, los animales alimentados por 3 meses con la dieta con un contenido de 21% de aceite de soya tuvieron una ganancia de peso de 18 g, mientras que los que consumieron una dieta con 7% de aceite de soya solo ganaron 7 g. Al final del estudio los ratones alimentados con 21% de aceite de soya tuvieron un peso de aproximadamente 40 g, el cual fue significativamente mayor que los que consumieron aceite de soya al 7%, los cuales alcanzaron un peso de 29 g. A pesar de que los ratones alimentados con 7% de aceite de soya tuvieron un peso 61% menor al final de estudio con respecto al grupo alimentado con aceite de soya al 21%, esta diferencia no fue proporcional en magnitud con respecto al consumo de energía de la dieta, sugiriendo que posiblemente la diferencia en ganancia de peso pudiera estar modulada por el gasto energético de cada uno de los grupos (figura 7).

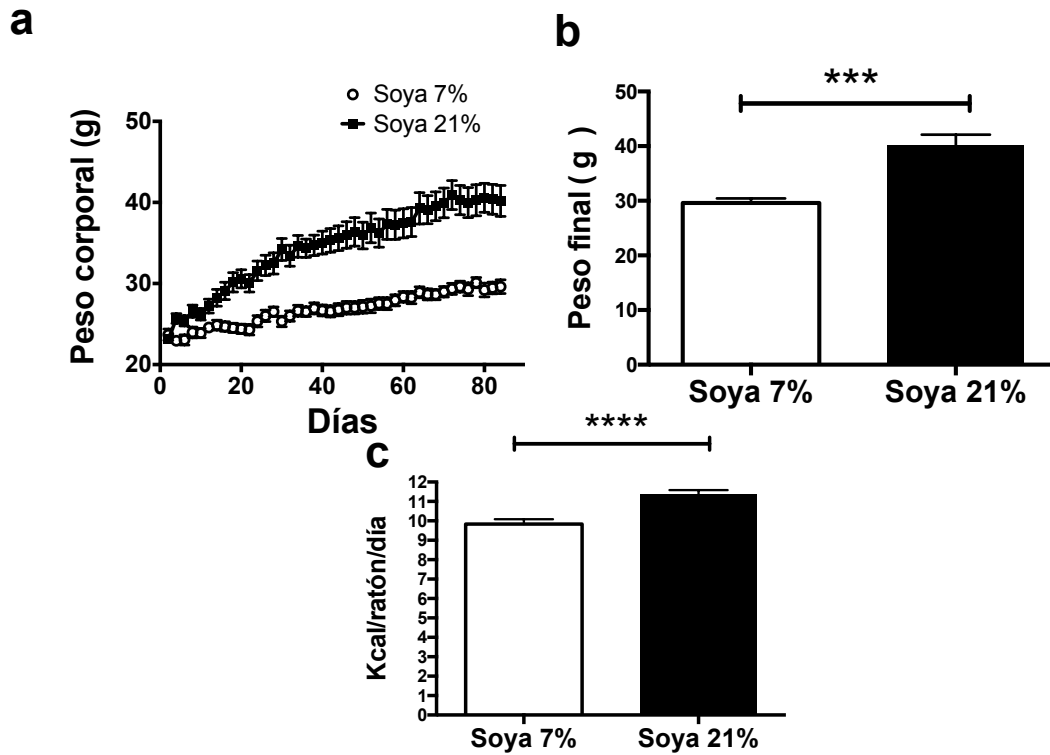


Figura 7. a) Ganancia de peso; b) Peso final; c) Ingesta calórica de los grupos de soya 7% y soya al 21%.

PESO RELATIVO DE LOS ÓRGANOS.

Como consecuencia de la diferencia en la ganancia de peso entre los dos grupos, se observó que en los animales alimentados con una dieta con 21% de aceite de soya tuvieron un mayor porcentaje de peso en el hígado, en la grasa epididimal y en la grasa perirenal comparado con aquellos animales alimentados con una dieta de aceite de soya al 7%. Se ha establecido que el incremento en la cantidad de grasa corporal genera adipocitos disfuncionales, lo cual se asocia con el desarrollo de anomalías en los parámetros bioquímicos. En la grasa parda no se observaron cambios significativos, porque no es un órgano de almacenamiento de grasa sino más bien de metabolización

de ella (figura 8). Se conoce que la activación de la grasa parda ocurre principalmente por vía adrenérgica, es particular por estimulación con el frío, pero los resultados del presente trabajo muestran que la concentración de la grasa en la dieta en forma de aceite de soya no altera a este tipo de grasa.

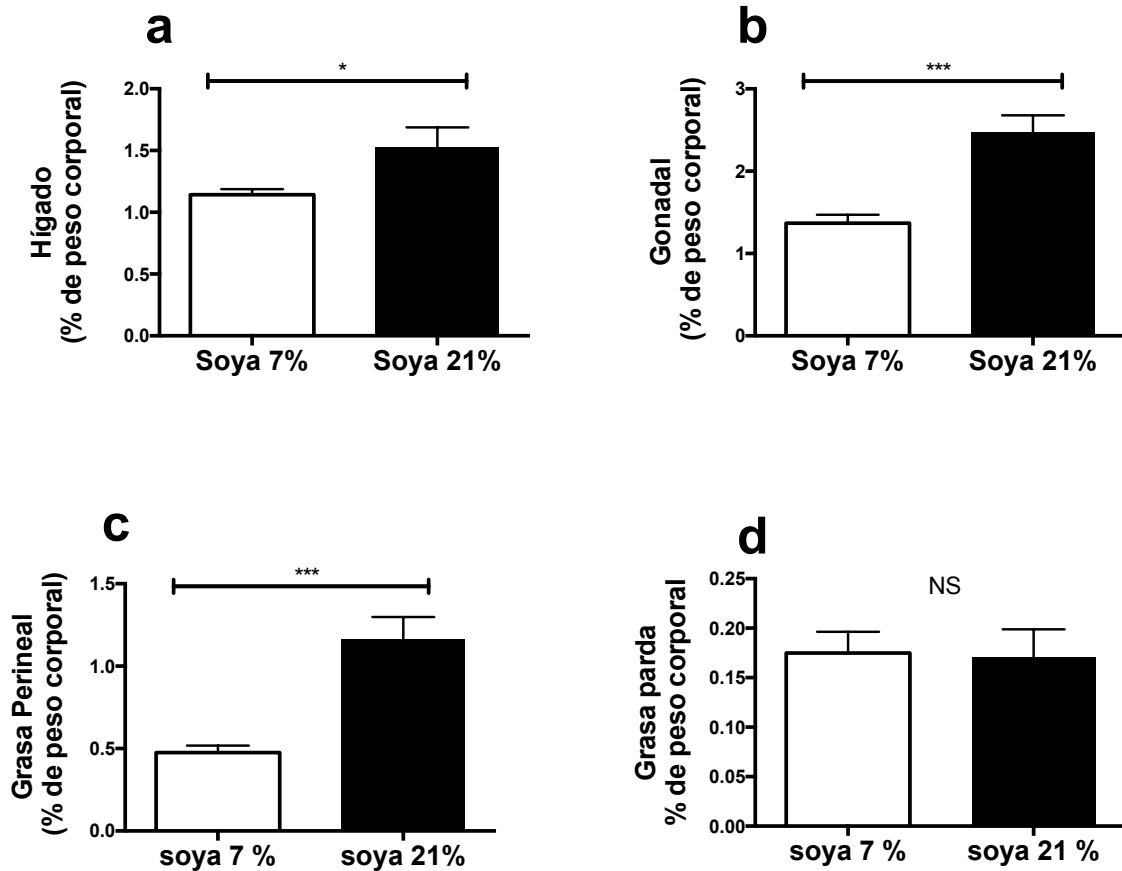


Figura 8. Medición porcentual de los pesos relativos de los órganos con respecto al peso corporal del ratón de los grupos soya 7% y soya 21% : a) hígado; b) gonadal; c) grasa perineal y d) grasa parda.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Debido al incremento en los depósitos de grasa blanca, se determinaron diversos parámetros bioquímicos en los ratones alimentados con las dos dietas experimentales, para evaluar el metabolismo de hidratos de carbono y el de

lípidos. A pesar de la diferencia en peso entre los dos grupos experimentales, los resultados mostraron que no hubo una diferencia significativa en las concentraciones de glucosa en el ayuno. En cuanto al metabolismo de lípidos, los datos experimentales tampoco mostraron una diferencia en las concentraciones de triglicéridos circulantes entre los dos grupos en ayuno. Sin embargo, el consumo de una dieta con 21% de aceite de soya incrementó significativamente el colesterol por un 27% y el colesterol HDL y el colesterol LDL también incrementaron significativamente por un 24% y un 44%, respectivamente (figura 9).

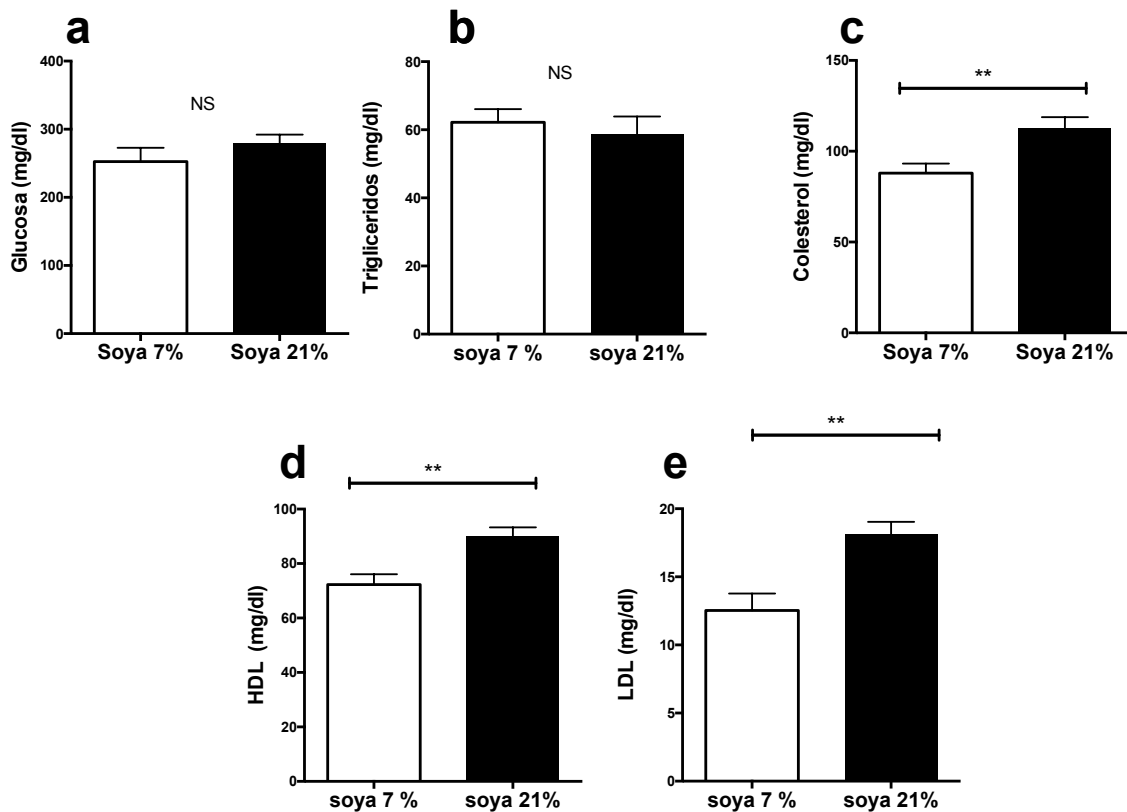


Figura 9: a) nivel de glucosa en suero; b) nivel de triglicéridos; c) nivel de colesterol; d) nivel de HDL y e) nivel de LDL de los grupos de soya al 7% y 21%.

CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en relación a las concentraciones de glucosa en ayuno, es bien conocido que el desarrollo de la obesidad se asocia con una intolerancia a la glucosa. Por lo que, para evaluar si existían cambios en la tolerancia a la glucosa se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa en los animales experimentales en ambos grupos. Los resultados mostraron claramente que aquellos animales alimentados con dieta al 7% de aceite de soya presentaron una menor elevación en los niveles de glucosa sanguínea cuando se inyectaron intraperitonealmente con una carga de 2g de glucosa por kg de peso corporal con respecto a los ratones alimentados con una dieta que contenía 21% de aceite de soya. De hecho cuando se cuantificó el área bajo la curva, se observó un incremento significativo de aproximadamente un 50% en los animales alimentados con dieta al 21% de aceite de en comparación con los alimentados con una dieta al 7% de aceite de soya (figura 10).

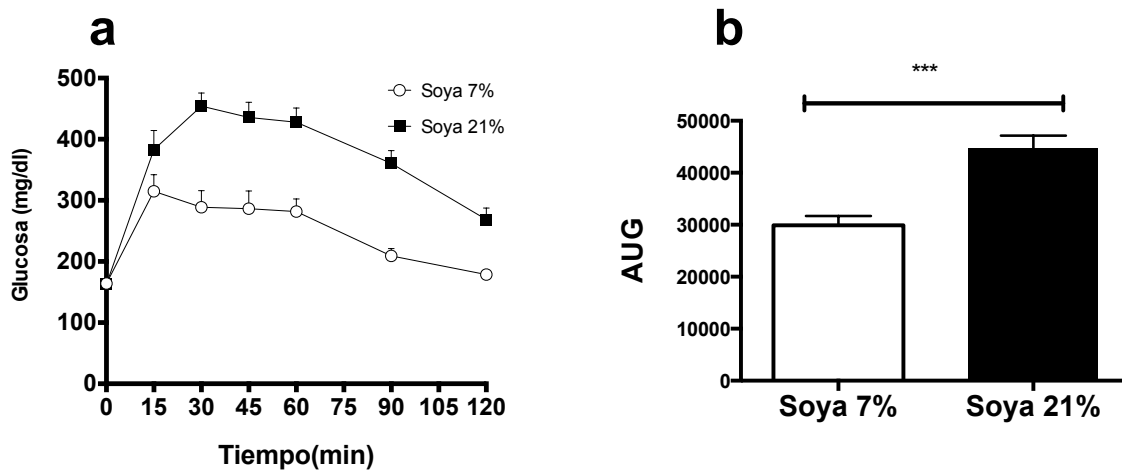


Figura 10. Curva de Tolerancia a la Glucosa: a) curvas de sensibilidad; b) áreas bajo la curva de los grupos al 7% y 21%.

SENSIBILIDAD A LA INSULINA

Las curvas de sensibilidad a la insulina miden que tan eficiente es un organismo para disminuir los niveles circulantes de glucosa cuando se le infunde insulina. Entre mas rápido y mayor sea el decaimiento de los niveles de glucosa en suero, mayor es la sensibilidad del organismo a la acción de la insulina. Se ha observado que con el desarrollo de obesidad se genera un aumento gradual de resistencia a la acción de la insulina. Los resultados del presente estudio concuerdan con la evidencia previa, ya que a aquellos que consumieron una dieta con aceite de soya al 7% ganaron menos peso, y estos fueron mas sensibles a la acción de la insulina con respecto al grupo alimentado con aceite de soya al 21%, el cual desarrolló una mayor ganancia de peso y tuvo una menor sensibilidad a la insulina. De hecho, el área bajo la curva fue un 28% menor para el grupo de soya al 7% con respecto a el grupo de soya al 21% ($p < 0.0001$).

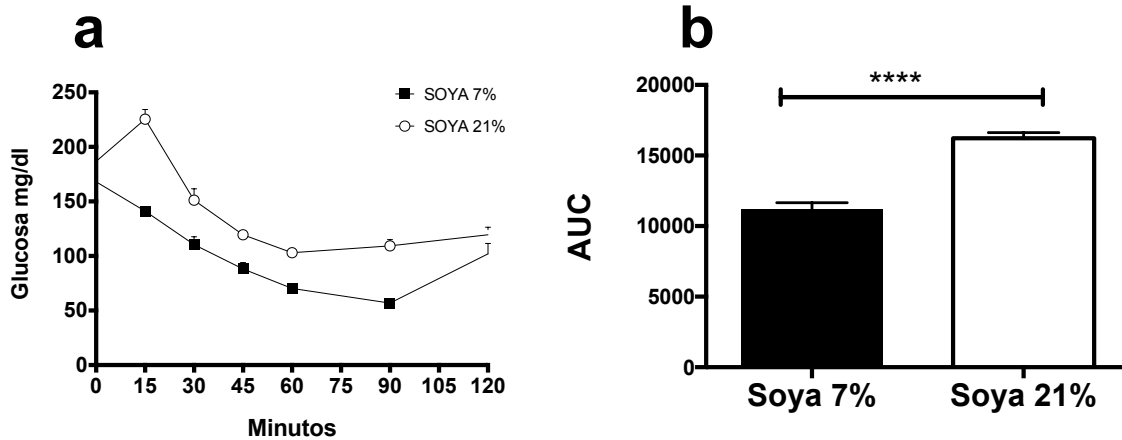


Figura 11. Sensibilidad a la insulina: a) curvas de sensibilidad a la insulina de soya al 21% y 7%; b) área bajo la curva.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y PARDO

Como se indicó anteriormente, los resultados mostraron claramente que los animales alimentados con dieta al 21% con aceite de soya tuvieron una mayor ganancia de peso y de grasa corporal que los alimentados con dieta con aceite de soya al 7%. Para evaluar si estas diferencias en peso corporal modificaban el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco, se realizaron análisis histológicos utilizando la tinción de hematoxilina/eosina. Como se muestra en la figura 12, los animales alimentados con dieta al 21% de aceite de soya mostraron adipocitos de un mayor tamaño tanto en el tejido adiposo epididimal como en el retroperitoneal con respecto a los de aceite de soya al 7%. En particular, los ratones alimentados con 7% de soya mostraron un mayor número de adipocitos por área. Por otro lado, también se realizó la evaluación histológica del tejido adiposo pardo, y los resultados mostraron que con una dieta al 21% con aceite de soya se pierde la morfología típica del tejido adiposo pardo, los cuales tienden a convertirse en un tejido con características de tejido adiposo blanco. Mientras que aquellos alimentados con aceite de soya la 7% mostraron una morfología típica del tejido adiposo pardo, indicativo de que este mantiene su capacidad termogénica.

Adicionalmente, en años recientes se ha demostrado que el tejido adiposo blanco puede diferenciarse a un tejido adiposo con algunas características semejantes a las del tejido adiposo pardo, el cual se ha denominado tejido adiposo beige o brite, el cual tiene una mayor actividad termogénica que el tejido adiposo blanco. Por lo que posteriormente se llevaron dos tipos de análisis para estudiar si la capacidad termogénica entre los dos grupos experimentales estaba modificada. El primero fue el estudio de calorimetría indirecta y el segundo el análisis de expresión de marcadores de apardeamiento del tejido adiposo blanco.

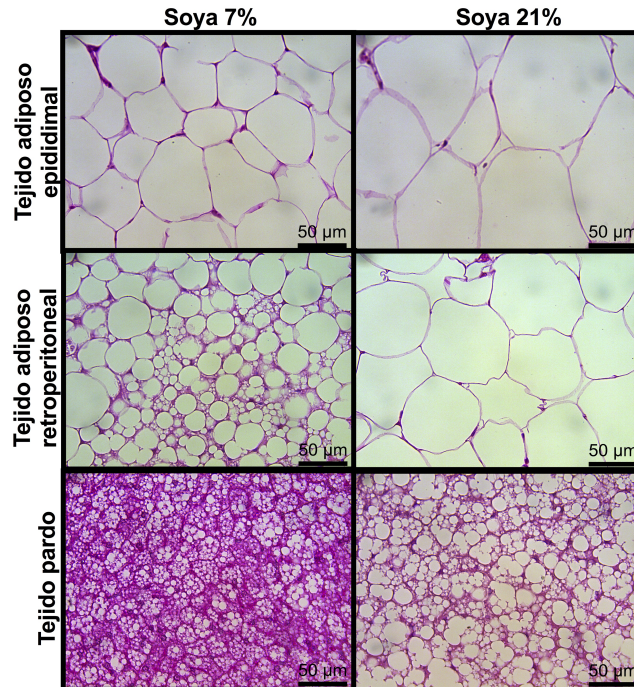


Figura 12. Histologías de los tejidos epididimal, retroperitoneal y pardo. Del lado izquierdo se muestran los respectivos tejidos con soya al 7% y en el lado derecho están las histologías con aceite de soya al 21%.

CALORIMETRÍA INDIRECTA

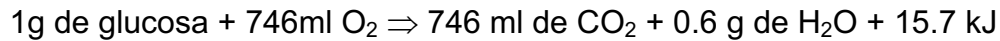
Para determinar el gasto energético, se realizó un ensayo de calorimetría indirecta. Los ensayos de calorimetría indirecta permiten la evaluación del metabolismo respiratorio que determina el volumen de oxígeno (VO_2) consumido y de dióxido de carbono (VCO_2) producido, parámetros con lo que se determina el coeficiente de intercambio respiratorio (RER).

$$RER = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

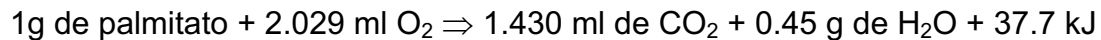
La relación entre el VCO_2/VO_2 es un indicador del tipo de sustrato (hidratos de carbono, proteínas, o grasas) metabolizado por el organismo como fuente de energía. Los hidratos de carbono, lípidos y proteínas son los principales

sustratos energéticos que son oxidados para producir energía. Así las proporciones de VO_2/ VCO_2 y la cantidad de energía liberada es diferente para cada uno de los tres sustratos-

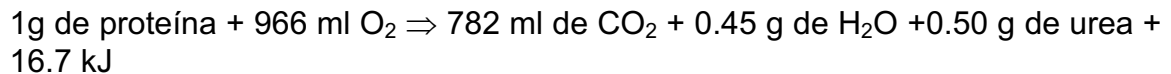
Para los hidratos de carbono la proporción de VCO_2 a VO_2 es 1.0 y la ecuación general:



Para los lípidos la proporción de VCO_2 a VO_2 es 0.705 y la ecuación general es:



Para las proteínas a pesar de la variabilidad en la composición de los aminoácidos se utiliza una ecuación general para la oxidación aproximada de una proteína estándar en la cual la proporción de VCO_2 a VO_2 es 0.81 asumiendo que la urea es el principal producto de desecho.



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

Para realizar las calorimetrías indirectas, los dos grupos de ratones alimentados con aceite de soya con concentraciones de 7% y 21% se colocaron en caja metabólicas individuales durante un periodo de 48 horas. Durante el tiempo que duro el estudio se mantuvo a los ratones con acceso libre a comida y agua, y con ciclos de luz oscuridad de 12 horas.

Los resultados mostraron que los animales alimentados con una dieta al 7% de soya tuvieron un mayor gasto energético durante la fase diurna y la nocturna comparado con aquellos animales alimentados con aceite de soya al 21%. El análisis del área bajo la curva mostró que los animales alimentados con una dieta al 21% tuvieron un gasto energético significativamente menor de aproximadamente 21% (figura 13) . Estos datos juntos con el análisis histológico son indicativos de que posiblemente el tejido adiposo blanco presentara una mayor diferenciación a tejido adiposo beige, por lo que el segundo propósito fue el de demostrar la presencia de marcadores del proceso de apardeamiento en el tejido adiposo blanco.

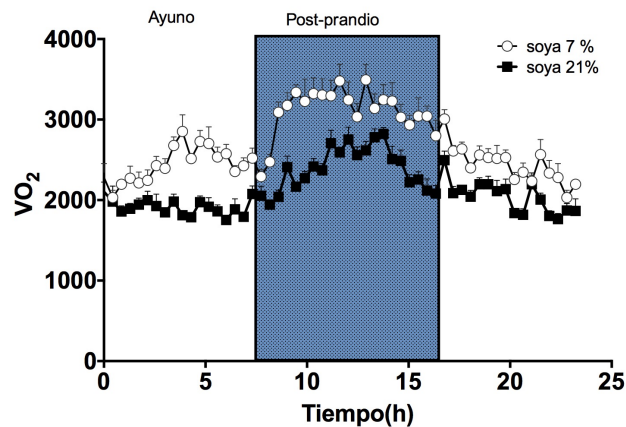


Figura 13. Consumo de Oxígeno de acuerdo a la cantidad de aceite de soya usada.

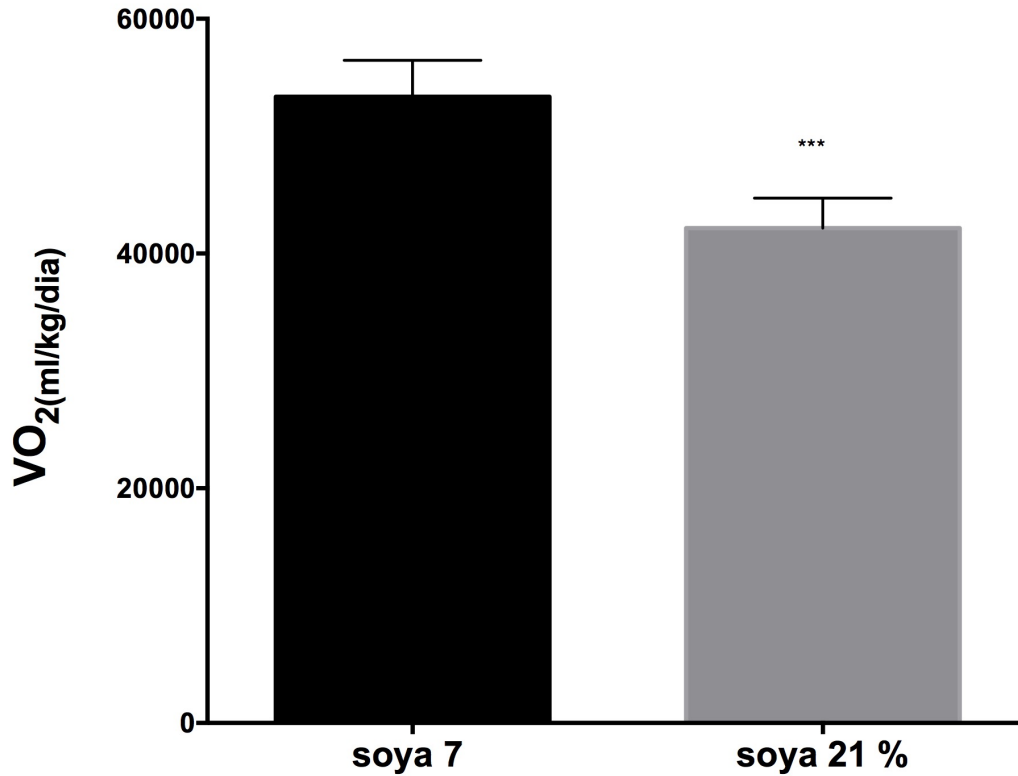


Figura 14. Área bajo la curva del consumo del volumen de oxígeno de aceite de soya.

Adicionalmente a partir del análisis de calorimetría indirecta se determinó también el RER. Se ha demostrado que el RER cambia substancialmente del paso de ayuno a realimentación. Cuando existe lo que se denomina flexibilidad metabólica, el RER que tiene un valor entre .7 a .8 y que indica que el principal substrato energético es los ácidos grasos principalmente provenientes del tejido adiposo, cambia a un valor cercano a 1 lo que se asocia con la utilización preferencial de glucosa como fuente de energía.

Como se puede observar en la figura 15 los ratones alimentados con dieta al 7% de aceite de soya presentaron una clara flexibilidad metabólica ya que su RER en ayuno de alrededor de 0.8 cambio a un RER de 1, mientras que los ratones alimentados con una dieta al 21% de aceite de soya presentaron una clara inflexibilidad metabólica ya que su RER en ayuno de 0.8 subido ligeramente

alrededor de 0.85 en la fase de realimentación, lo cual es indicativo de la disfuncionalidad del tejido adiposo.

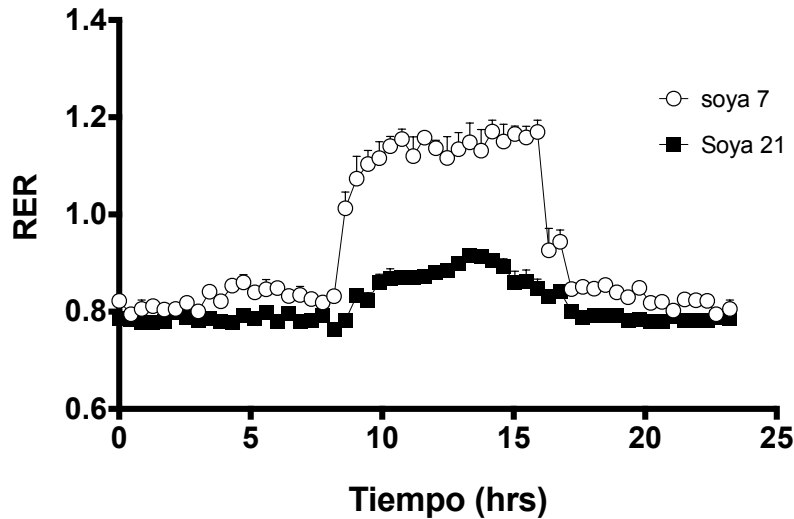


Figura 15. Mediciones de RER de los grupos de soya al 7% y al 21% durante un periodo de 24 horas en un segmento dividido en ayuno y post-prandio.

RT-PCR

Expresión de marcadores de apardeamiento a nivel de ARNm en tejido adiposo blanco.

En los últimos años se han establecido la presencia de un grupo de proteínas que han sido consideradas como biomarcadores del proceso de apardeamiento. La principal proteína que se asocia con el incremento en la capacidad termogénica del tejido adiposo beige es la proteína desacoplante 1, conocida por sus siglas en inglés UCP1 (Uncoupling protein 1). Esta proteína se asocia con la disipación del gradiente de protones generados por la cadena respiratoria, utilizando la energía de este gradiente para la producción de calor, lo que disminuye la utilización del gradiente de protones a ser utilizado por la ATP sintasa para la producción de ATP. Los datos experimentales mostraron que el consumo de una dieta al 21% con aceite de soya disminuyó la abundancia

relativa del RNA mensajero de UCP1 y de marcadores del apardeamiento como PGC1 alfa y PDRM16. La abundancia del RNA mensajero del receptor nuclear PPAR gama no mostro una diferencia significativa (figura 16).

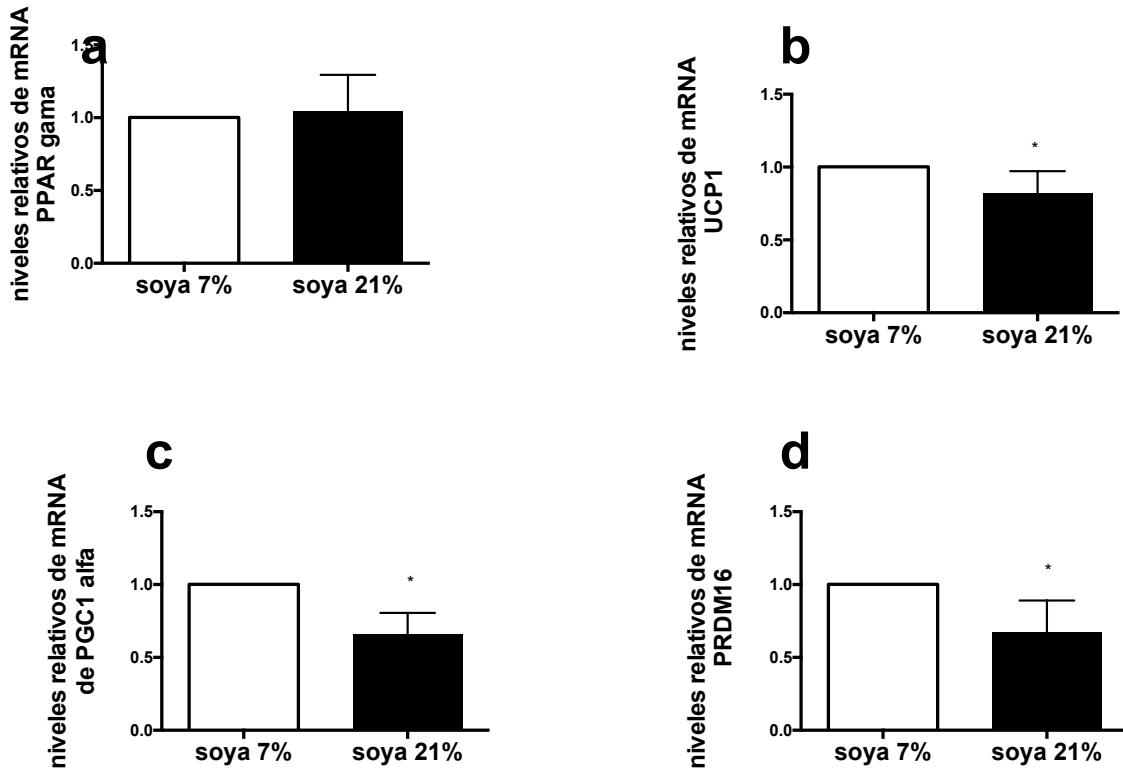


Figura 16. Niveles de expresión relativos de mRNA de los grupos de soya al 7 % y 21%: a) ppar 1 γ ; b) UCP-1; c)PGC1 α y d) PRDM16.

DISMINUCIÓN DEL MARCADOR UCP-1 DE APARDAMIENTO DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO.

Se ha demostrado que la abundancia de el RNA mensajero de UCP1 durante el proceso de apardeamiento incrementa notablemente en los primero tres días del proceso y después decae hasta mostrar diferencias relativamente pequeñas comparadas con adipocitos no estimulados. Sin embargo, se ha mostrado que los niveles de la abundancia de la proteína UCP1 tienden a incrementar de

manera importante con el estímulo del proceso de apardeamiento. En el presente estudio se observó claramente que el análisis por Western blot de UCP-1 que la abundancia de esta proteína que incrementa la actividad termogénica se incrementó de manera significativa en los animales alimentados con dieta con aceite de soya al 7% comparada con aquellos alimentados con dieta al 21% con aceite de soya. Estos resultados indican que el consumo excesivo de aceite de soya reduce la síntesis de UCP-1 lo que disminuye la capacidad termogénica del tejido adiposo blanco, lo que se asocia con una mayor ganancia de peso corporal como se indico anteriormente. Por otro lado, se ha demostrado que los cambios en la capacidad termogénica se asocia con modificaciones en la microbiota intestinal.

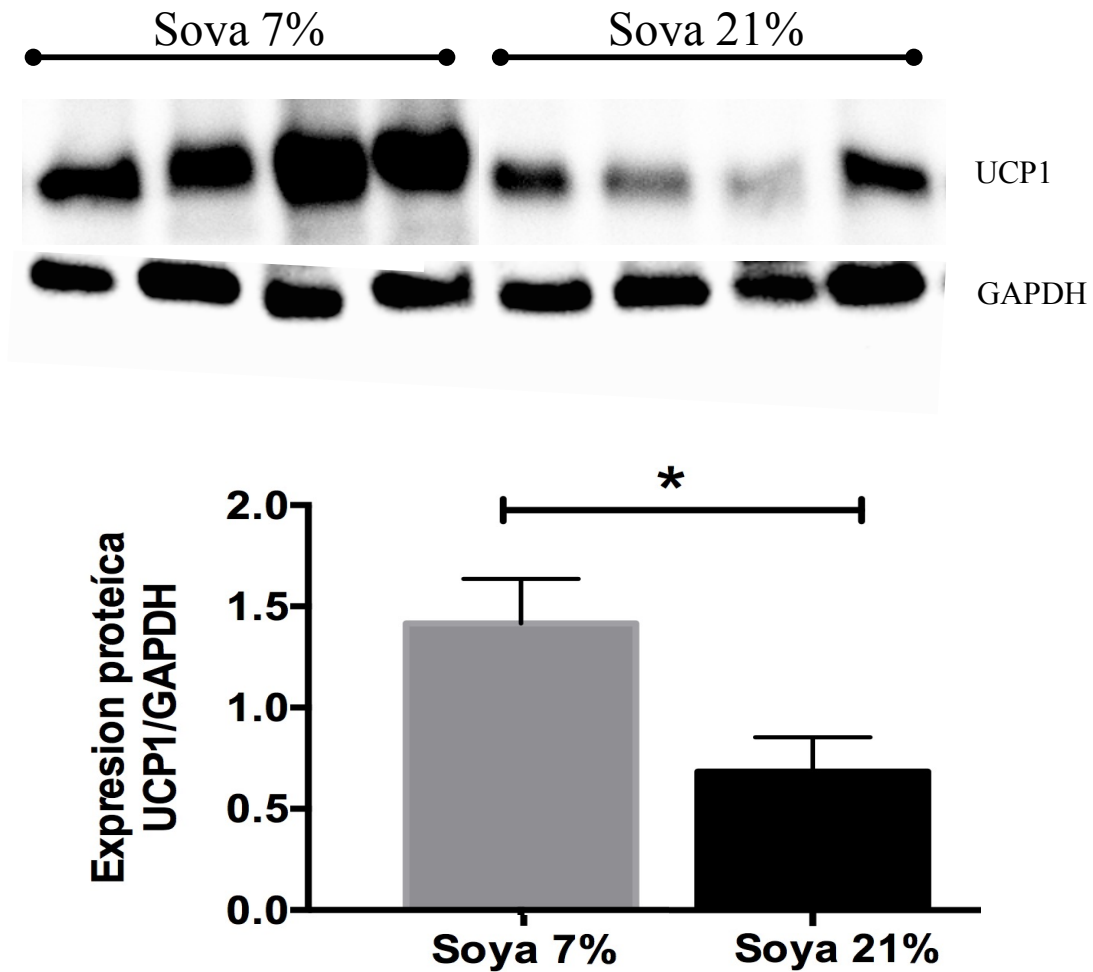


Figura 17 Western Blots de UCP-1 y gráficos de área bajo la curva

ANÁLISIS DE LA MICROBIOTAL INTESTINAL POR SECUENCIACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S.

Un Consumo Crónico de Aceite de Soya Genera una Menor Diversidad.

Al realizarse la secuenciación masiva del gen ribosomal 16 s, el análisis de la α diversidad (Rarefraction) en el grupo alimentado con aceite de soya al 7%, identifico 540 otus (especies) mientras que en el grupo alimentado con aceite de soya al 21% identifico 480 otus. Este análisis de α diversidad reveló que el consumo de aceite de soya en exceso promovió una menor diversidad de la microbiota intestinal (Figura 18).

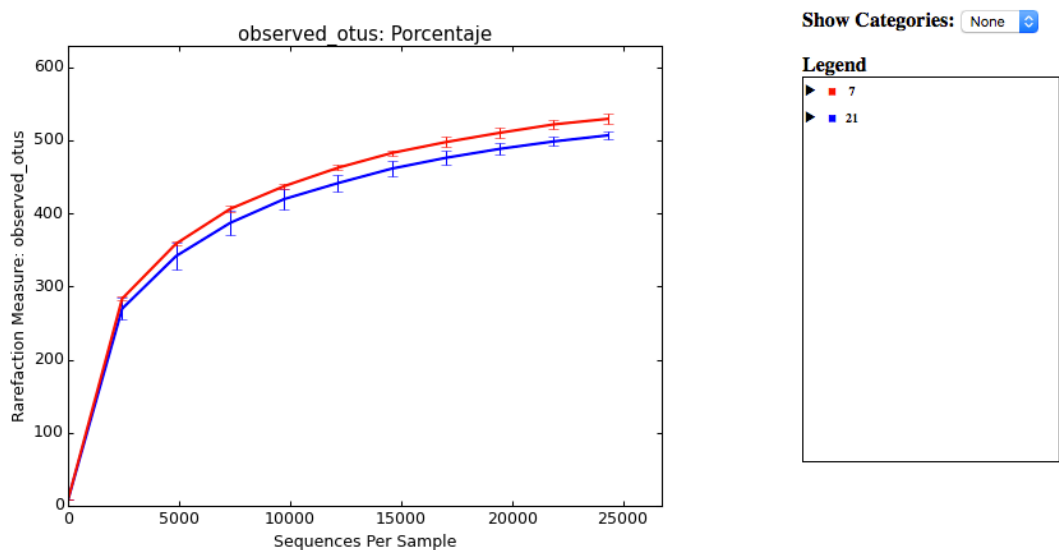


Figura 18. Curva de α diversidad (rarefacción) obtenida de la secuenciación masiva con el gen ribosomal 16s.

LA DIETA AIN93 G FAVORECE UN CAMBIO EN LA POBLACIÓN BACTERIANA DE LA MICROBIOTA.

Se realizó también un análisis de componentes principales para conocer el grado de variación que existe entre las comunidades microbianas de los animales que consumieron aceite de soya al 7% con respecto a las que consumieron aceite de soya al 21%. En la figura 19 se puede observar que ambas comunidades se agruparon de manera diferente, mostrando que el consumo de aceite de soya al 21% hizo que cambiara la comunidad bacteriana en el intestino de las ratas con respecto a las que consumieron aceite de soya al 7%. Estos resultados indican que la ecología de la microbiota intestinal cambio en función de la concentración de aceite presente en cada una de las dietas utilizadas. Esto indica que el porcentaje de aceite consumido es un factor importante que puede provocar un cambio en la diversidad de la microbiota, la cual se necesita mantener en un buen equilibrio debido a la importancia entre las interacciones de la microbiota con el organismo. Según estos resultados el consumo elevado de aceite de soya de manera crónica puede causar cambios

que son desfavorables a la diversidad de la microbiota y producir cambios no benéficos a la salud a largo plazo (figura 19).

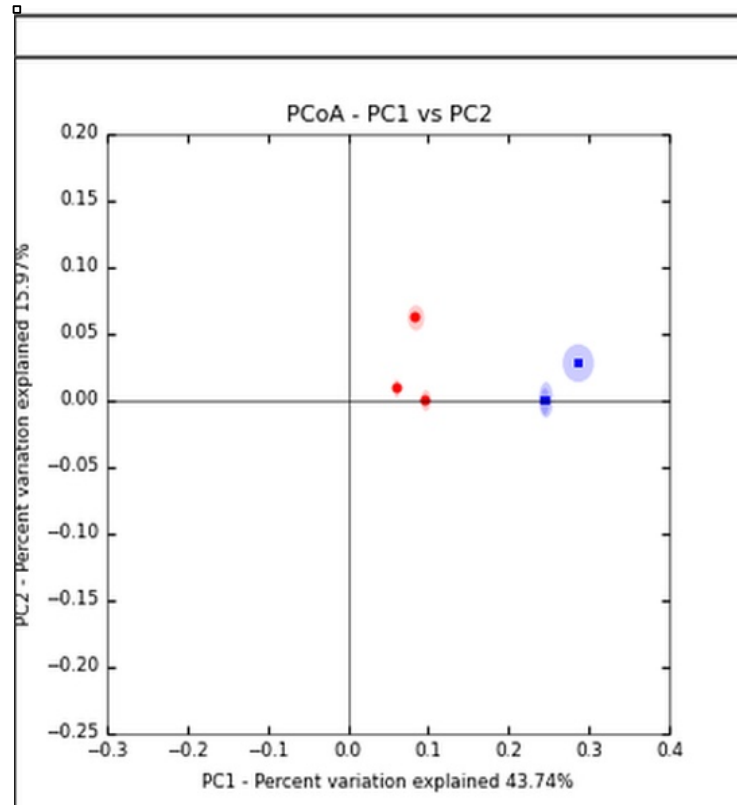


Figura 19. Análisis de componentes principales pCOA

Abundancia a nivel de Filum de la microbiota, el consumo de grasa crónica genere el crecimiento del filo bacteriano *Tenericutes*.

Para poder medir la composición de la microbiota a nivel de Filos se utilizó la secuenciación masiva utilizando el gen ribosomal 16s y los datos se analizaron por medio del programa QIIME. En el gráfico de abundancia relativa (Figura 20) se encontró que los *Firmicutes* en el grupo alimentado con dieta con aceite de soya al 21% tuvieron una abundancia de 36% mientras que el grupo con dieta de aceite de soya al 7% I tuvo una abundancia de 34%. Los *Tenericutes* en el grupo de aceite de soya al 21% tuvieron una abundancia de 18% pero en el

grupo de aceite de soya al 7% tuvieron una abundancia de 10%. En el Filo de *Bacteroidetes* no se observó que existiera una gran diferencia entre estos dos grupos. Los demás filios en los dos grupos fueron comparables.

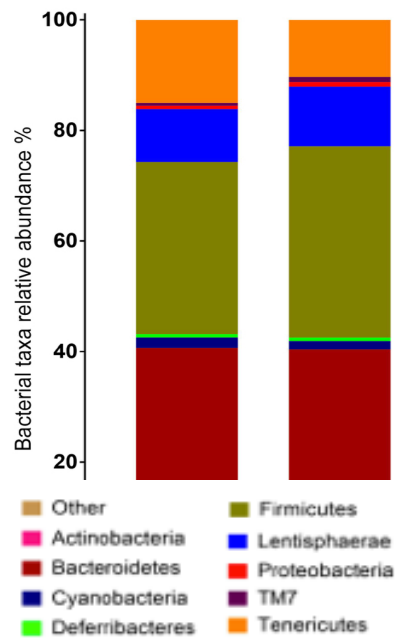


Figura 20. Abundancia relativa a nivel de Filums

ANÁLISIS POR PCR DE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA

Los análisis de PCR se realizaron para tener como objetivo principal una perspectiva de la composición de la microbiota a nivel de algunos géneros bacterianos que incluían a los *Bacteroidetes*, *Lactobacillus* y *Prevotella*. Mediante este análisis se evaluó si la composición a nivel de algunos géneros bacterianos de la microbiota intestinal se puede alterar por el consumo crónico de aceite de soya. Se evaluaron estos géneros tanto en el grupo alimentado con dieta de aceite de soya al 7% y como en el alimentado con aceite de soya al

21%. Con respecto al género *Lactobacillus*, se encontró que el grupo alimentado con dieta al 21% de aceite de soya tuvo una mayor abundancia de *Lactobacillus* que el grupo alimentado con dieta al 7% de aceite de soya (figura 21).

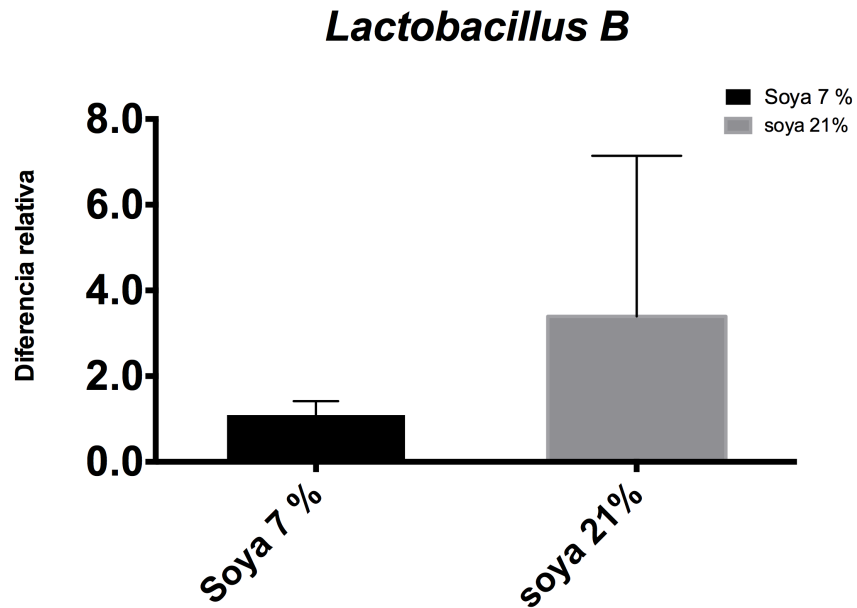


Figura 21. Abundancia de el filo *Lactobacillus* en el grupo control y grupo tratamiento.

El segundo Género estudiado fue el de *Bacteroides*. El grupo con dieta al 7% de aceite de soya tuvo una menor abundancia de este género con respecto al grupo alimentado con dieta al 21% de aceite de soya. Este resultado indica que el aumento en el consumo de aceite de soya disminuye la proliferación de *Bacteroidetes* (Figura 22).

Bacteroidetes B

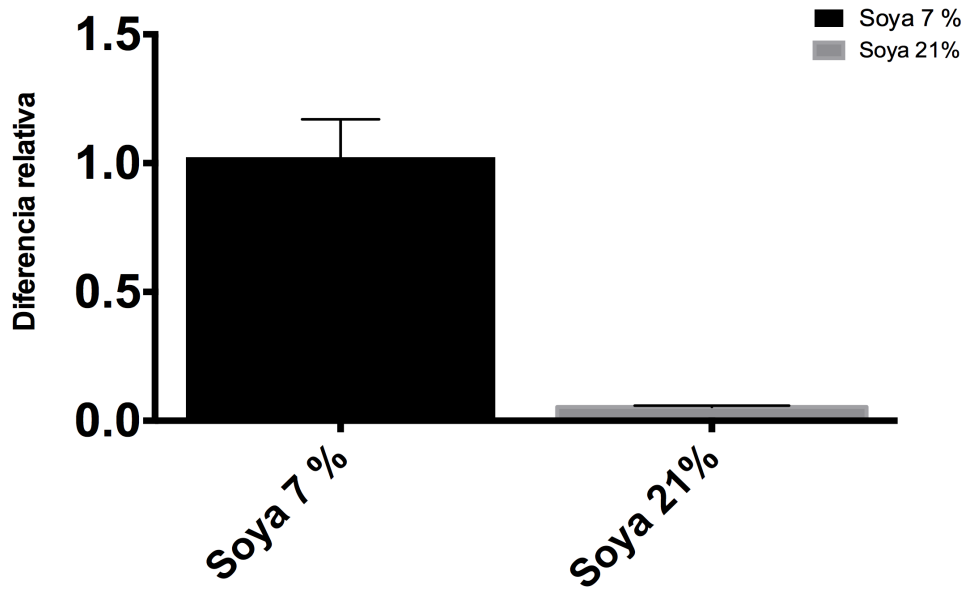


Figura 22. Abundancia de el Filo *Bacteroidetes* en el grupo control y grupo tratamiento.

Después, el tercer género estudiado fue el de *Prevotella*. Se encontró que el grupo alimentado con dieta con aceite de soya al 7% tuvo una mayor abundancia que el grupo con dieta de aceite de soya al 21% (Figura 23).

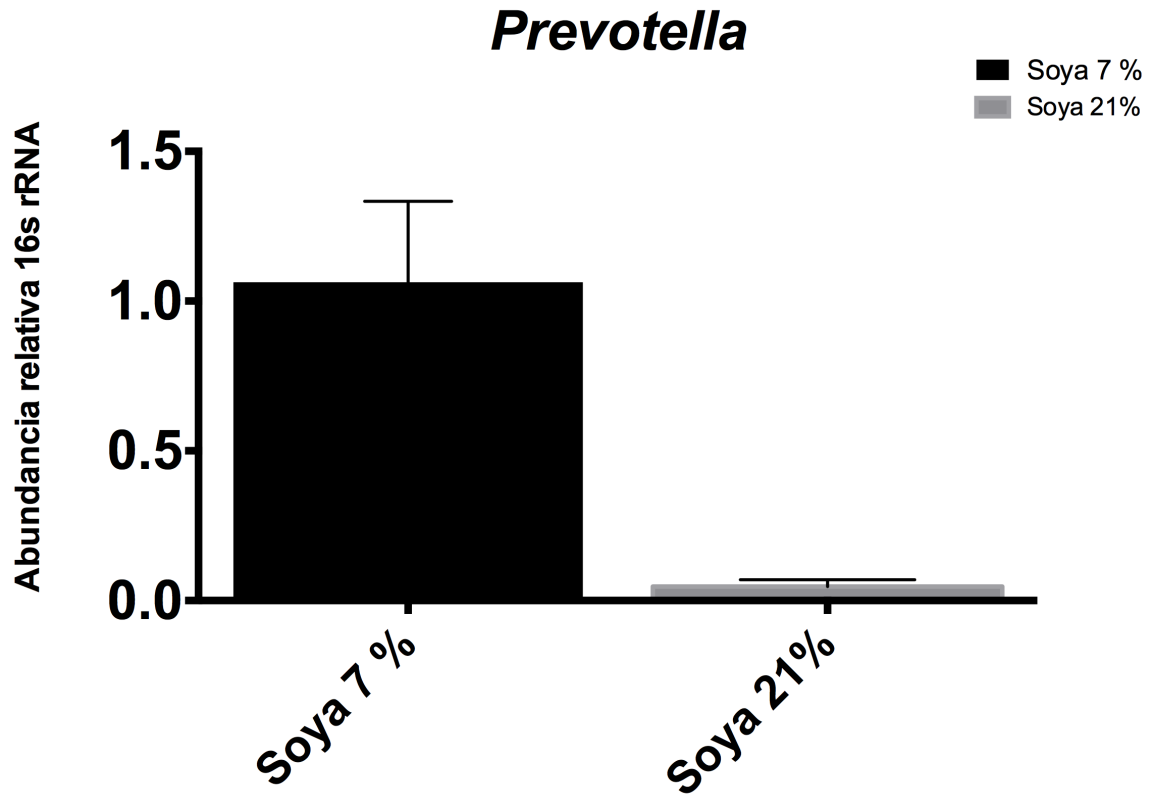


Figura 23 Abundancia relativa del Filo *Prevotella* en los grupos estudiados

Discusión y conclusiones

En las dos últimas décadas se ha extendido, lo que se considera, una epidemia de obesidad alrededor del mundo, la cual varía en una mayor ó menor grado entre países (Reilly, El-Hamdouchi et al. 2018). Esto ha causado una problemática de salud ya que se han incrementado las enfermedades crónico degenerativas, particularmente la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares, las cuales han incrementado la tasa morbi mortalidad de la población (Lazar 2005). Existen múltiples factores asociados al desarrollo de obesidad dentro de los cuales los estudios se han centrado principalmente factores ambientales y genéticos (Speakman 2004). Sin embargo han aparecido nuevos factores antes desconocidos como son la transferencia cambios epigenéticos de la madre al producto en la etapa fetal, o por cambios iniciales de

exposición al medio ambiente en los primeros días de vida, y por otro lado un factor central que se ha demostrado que juega un papel central con el desarrollo de la obesidad es la microbiota intestinal (Ley, Turnbaugh et al. 2006, Turnbaugh, Ley et al. 2006, Herrera, Keildson et al. 2011, Ge, Liang et al. 2014, Lopomo, Burgio et al. 2016).

No obstante, la dieta es un factor preponderante que determina de manera muy evidente el desarrollo de la obesidad. En particular, un desequilibrio entre la energía ingerida a través de la dieta y el gasto energético dado por la actividad física, la acción dinámica específica y de manera muy importante el metabolismo basal (Romieu, Dossus et al. 2017). Dentro de los componentes energéticos de la dieta, se ha establecido que el consumo excesivo de hidratos de carbono y de grasas son principales responsables del problema de obesidad (Brown, Storlien et al. 2010). En particular, dentro de las grasas existe una gran heterogeneidad entre ellas, ya que los ácidos grasos que contienen varían de manera importante, dependiendo de su contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Tovar, Diaz-Villasenor et al. 2011, Diaz-Villasenor, Granados et al. 2013). Dentro de las grasas, los aceites de origen vegetal son ampliamente consumidos por la población, y uno de estos aceites, el de soya. Se conoce que el aceite de soya es el aceite comestible más consumido en los Estados Unidos (Portal) 2017) debido a su disponibilidad, costo y versatilidad en las aplicaciones de productos alimenticios . En México es también uno de los mas utilizados. Por lo tanto, es necesario aumentar el número de estudios que utilizan animales de experimentación y estudios clínicos en humanos con el fin de obtener conocimiento de los posibles efectos que tenga para la salud.

El presente estudio muestra varios aspectos importantes de los efectos metabólicos que se observan en el modelo experimental del ratón. Así mismo demuestra que cuando se consume un exceso de este aceite, los beneficios

metabólicos desaparecen. Esto concuerda con evidencia previa que muestra que al consumir grasa o aceite en exceso, se pierde la funcionalidad de varios tejidos y órganos, particularmente el tejido adiposo (Tovar, Diaz-Villasenor et al. 2011, Diaz-Villasenor, Granados et al. 2013). Un tejido adiposo funcional permite mantener un metabolismo de hidratos de carbono y lípidos adecuado en todo el organismo. Dentro de las actividades de un tejido adiposo funcional se encuentran el que sea capaz de almacenar el exceso de energía consumido en la dieta en forma de triglicéridos, de manera que no exista un exceso esencialmente de ácidos grasos libres circulantes que puedan generar lipotoxicidad en diversos órganos como el hígado, el músculo esquelético, el corazón y el páncreas entre otros (Unger and Orci 2001, Vazquez-Vela, Torres et al. 2008). Además, el tejido adiposo funcional puede liberar ácidos grasos principalmente bajo condiciones de un déficit energético como ocurre durante el ayuno. Finalmente, este tejido adiposo funcional puede oxidar un porcentaje de la grasa para mantener un balance adecuado en la concentración intracelular de estos (Unger and Orci 2001, Vazquez-Vela, Torres et al. 2008). El balance de estas funciones se pierde cuando se consume un exceso de grasa, lo cual se observó en el presente estudio en donde, al consumir 3 veces el requerimiento de grasa recomendado por el American Institute of Nutrition (Reeves, Nielsen et al. 1993), los animales desarrollaron un aumento significativo en la ganancia de peso, lo que concuerda con estudios previos experimentales.

Esta ganancia de peso, se asoció con un incremento en el tamaño del hígado y del tejido adiposo en sus diversos panículos, excepto el de grasa parda, debido a que no está ocurriendo un proceso de apardeamiento. De hecho, a pesar de que no se está generando tejido adiposo pardo, la evidencia histológica lo que muestra es que el fenotipo de este tejido, el cual se caracteriza por ser multilocular, es decir que presenta múltiples vesículas lipídicas de tamaño pequeño, está cambiando a un tejido semejante al blanco, el cual es unilocular, es decir que presenta una vesícula grande de lípidos. De hecho este cambio en

el fenotipo se acompaña de una disminución de UCP-1, lo que reduce su capacidad termogénica como se explica en mayor detalle mas adelante. Por otro lado, se ha establecido que estos resultados se asocian con el desarrollo de lipotoxicidad, y una de las condiciones que se incrementa durante este proceso es la resistencia a la insulina (Yazici and Sezer 2017). Los resultados del presente estudio muestran que el consumo excesivo de aceite disminuyo la sensibilidad a la insulina en comparación con el grupo que consumió aceite de soya en la concentración recomendada.

Por otro lado, es importante indicar que el consumo de aceite de soya de acuerdo con la recomendación de American Institute of Nutrition generó beneficios metabólicos importantes. El consumo de una dieta con aceite de soya al 7% permitió que los animales de experimentación tuvieran una buena tolerancia a la glucosa, así como una adecuada sensibilidad a la insulina. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en humanos en donde la evidencia epidemiológica y los estudios de intervención muestran claramente que en los humanos las grasas saturadas empeoran significativamente la resistencia a la insulina, mientras que el consumo de dietas con ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados en una concentración adecuada mantienen una mejor sensibilidad a la insulina (Riccardi, Giacco et al. 2004). Por lo que se ha recomendado para mejorar la sensibilidad a la insulina y las anomalías metabólicas asociadas a esta, una reducción de la grasa saturada en la dieta, y un reemplazo parcial de esta por grasa monoinsaturada y poliinsaturada en concentraciones apropiadas, los cuales están presentes en el aceite de soya (Miller et al, 2016). Sin embargo, este trabajo muestra que un exceso de este tipo de aceite en alta concentración pierde sus efectos para la salud, como ha sido demostrado previamente con este y otros aceites cuando se consumen en exceso (Tovar AR, et al, 2011).

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de aceite de soya de acuerdo con las recomendaciones de la AIN 93, produce un menor aumento de peso que aquellos que consumen aceite de oliva o de coco sin cambiar la grasa corporal. Además, dado que el aceite de soya, como se mostro en el presente estudio, disminuye la síntesis de ácidos grasos y estimula la oxidación de ácidos grasos, este aceite mantiene el tamaño hepático evitando la acumulación de grasa, mientras que el consumo de aceite de oliva y particularmente el aceite de coco aumentan el tamaño del hígado, y este aumento del tamaño del hígado (hepatomegalia) se asocia con inflamación hepática. De hecho, consumir la cantidad recomendada de grasa como aceite de soya, no produce esteatosis hepática que es la acumulación de grasa en el hígado, mientras que el consumo de aceite de coco en el porcentaje recomendado en la dieta, claramente produce acumulación de grasa en el hígado. Por lo que el consumo de aceite de soya en las cantidades recomendadas, tiene la capacidad de mejorar la tolerancia a la glucosa. Este efecto no se observa en animales alimentados con aceite de oliva, pero especialmente en aquellos alimentados con aceite de coco. Estudios moleculares demuestran que este efecto benéfico del aceite de soya se debe posiblemente a una mejora en la vía de señalización de insulina que permite un aumento en el número de transportadores de glucosa en la membrana de diferentes células, en particular del músculo esquelético, lo que lleva a una absorción rápida de glucosa en las células, normalizando rápidamente las concentraciones de glucosa en plasma (Pei, Xie et al. 2017) .

Por otro lado, se ha demostrado que con el desarrollo de obesidad se disminuye la capacidad de apardeamiento del tejido adiposo blanco, a través de una disminución de UCP1 (Rodrigues, Pereira et al. 2018). La proteína desacoplante 1 (UCP1) es la proteína característica responsable de inducir la termogénesis. La UCP1 se expresa de forma ubicua en la membrana interna mitocondrial de los adipocitos pardos. Su actividad principal es la disipación del gradiente de

protones generado por la cadena respiratoria, aumentando así la permeabilidad de la matriz mitocondrial y permitiendo la filtración de protones. Por lo tanto, reduce la eficiencia de la maquinaria respiratoria celular, lo que resulta en un aumento de la disipación de calor, que proporciona las propiedades termogénicas del tejidos. Debido a la creciente tasa de obesidad y diabetes y los riesgos metabólicos asociados, como altos niveles de triglicéridos y colesterol en el plasma, que imponen un riesgo de enfermedad cardiovascular (Hokanson and Austin 1996), se están explorando nuevas alternativas, como el apardeamiento del tejido adiposo blanco, para contrarrestar el desequilibrio energía lo que puede prevenir y/o atenuar la obesidad y sus alteraciones asociadas (Cypess and Kahn 2010). De hecho, se ha demostrado en un modelo de ratón que la inducción del apardeamiento por la exposición al frío a corto plazo reduce la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina (Bartelt, Bruns et al. 2011). Los resultados experimentales del presente trabajo muestran que al consumir una dieta con un contenido adecuado en aceite de soya se expresan las proteínas asociadas con el proceso de apardeamiento, incluyendo a la UCP1, PGC1a y PDRM16 en comparación de los que consumen un exceso de aceite de soya. De hecho, el incremento en UCP1 se observo también a nivel de la abundancia de su proteína.

Varios estudios han demostrado una estrecha conexión entre la dieta y la microbiota que indica cómo la composición de las diferentes dietas tiene un impacto directo en la microbiota intestinal (Clarke, Murphy et al. 2012, Scott, Gratz et al. 2013). Se ha observado en ratones que el cambio de una dieta baja en grasas y rica en polisacáridos a una dieta rica en grasas y azúcares, altera la composición de la microbiota en un solo día (65). De forma similar, los ratones alimentados con una dieta vegetariana, rica en fibras dietéticas, modifican la microbiota intestinal en comparación con los controles. Los primeros estudios en ratones y en humanos obesos muestran que se presenta una composición diferente de la microbiota intestinal en comparación con los controles delgados.

Varios estudios muestran un aumento en las bacterias del filo *Firmicutes* y una disminución en el filo *Bacteroidetes* que se cree que está asociada con una mayor absorción de energía de los alimentos y un aumento de la inflamación de bajo grado (Ley, Backhed et al. 2005, Turnbaugh, Ley et al. 2006).

En el presente trabajo se observó que los beneficios metabólicos al consumir una cantidad adecuada de aceite de soya se asociaron con cambios en la microbiota intestinal. El análisis de alfa diversidad, mostro que la microbiota intestinal de los animales que consumieron una dieta adecuada en aceite de soya tienen una mayor diversidad bacteriana con respecto a aquellos que consumieron una dieta con un alto contenido de grasa. La pérdida de diversidad de microbiota aparece como el hallazgo más constante de disbiosis intestinal. La mayoría de las enfermedades humanas que afectan a los países occidentalizados se asocian con disbiosis que se acompaña de una pérdida de diversidad microbiana en la microbiota intestinal (Mosca, Leclerc et al. 2016).

Los beneficios metabólicos de consumir una cantidad adecuada de aceite de soya se asociaron con cambios en la microbiota intestinal. El análisis de alfa diversidad, muestra que la microbiota intestinal de aquellos animales que consumen una dieta adecuada en aceite de soya tienen una mayor diversidad bacteriana que aquellos que consumen una dieta con un alto contenido de grasa. Así mismo el análisis de beta diversidad indica que las poblaciones bacterianas son diferentes entre las ratas alimentadas con dieta adecuada en comparación con aquellas con una dieta alta en aceite de soya.

En el presente estudio se observó que el consumo de una dieta alta en grasa mostro una disbiosis en cuanto a la composición de la microbiota, evaluada mediante el uso del gen ribosomal 16 S, que se asoció con una disminución de la diversidad microbiana intestinal. En particular los *Firmicutes* incrementaron su

abundancia en estos animales, así mismo también el Filum de *Tenericutes*. En cuanto a los análisis por RT-PCR se hicieron como complemento a los de secuenciación del gen 16S ribosomal. En ellos también se observaron cambios de abundancia relativa. Aunque no estudiamos varios de los Filums que se analizaron en la microbiota obtenida por secuenciación, si se analizaron los más importantes como *Bacteroidetes*, *firmicutes* y *Lactobacillus*. Los incrementos del filo *Bacteroidetes* se observaron tanto en los estudios de PCR como en los estudios de genómica bacteriana evaluada por secuenciación del gen 16S rRNA.

CONCLUSIONES

- 1) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition tiene algunos beneficios: atenúa la ganancia de peso, el tamaño del hígado y del contenido de grasa perirenal y gonadal, con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación.
- 2) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition mantiene algunos parámetros bioquímicos dentro del rango adecuado, particularmente el colesterol total y el colesterol LDL con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación.
- 3) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition mantiene una adecuada tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación.

4) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition mantiene un tamaño y características adecuadas de los tejidos adiposos blanco y pardo con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación, los cuales desarrollan hipertrofia del tejido adiposo blanco y blanqueamiento del tejido adiposo pardo.

5) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition mantiene la flexibilidad metabólica evaluada por el RER con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación.

6) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition estimula el apardeamiento del tejido adiposo blanco, capacidad que se pierde cuando se consume 3 veces la recomendación de aceite de soya.

7) El consumo de la cantidad recomendada de aceite de soya por el American Institute of Nutrition incrementa la diversidad bacteriana de la microbiota intestinal y genera una microbiota con diversidad y abundancia diferente estimulando la proporción de *Bacteroidetes* con respecto a los que consumen 3 veces la recomendación.

.

PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio de secuenciación de la metagenómica y de la transcriptómica bacteriana para profundizar con más detalles como están ocurriendo estos cambios en la microbiota del intestino por efecto del consumo de aceite de soya.

- Evaluar por medio de metabolómica si hay metabolitos que se produzcan por la microbiota se observen en la circulación sanguínea y sean en parte responsables de los efectos en la salud por el consumo de aceite de soya.

REFERENCIAS

Alcock, J., & Lin, H. C. (2015). Fatty acids from diet and microbiota regulate energy metabolism. *F1000Res*, 4(F1000 Faculty Rev), 738. doi: 10.12688/f1000research.6078.1

Aron-Wisnewsky, J., & Clement, K. (2014). The effects of gastrointestinal surgery on gut microbiota: potential contribution to improved insulin sensitivity. *Curr Atheroscler Rep*, 16(11), 454. doi: 10.1007/s11883-014-0454-9

Aviv, G., Rahav, G., & Gal-Mor, O. (2016). Horizontal Transfer of the Salmonella enterica Serovar Infantis Resistance and Virulence Plasmid pESI to the Gut Microbiota of Warm-Blooded Hosts. *MBio*, 7(5). doi: 10.1128/mBio.01395-16

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15718-15723. doi: 10.1073/pnas.0407076101

Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., . . . Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, 17(2), 200-205. doi: 10.1038/nm.2297

Bartelt, A., & Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10(1), 24-36. doi: 10.1038/nrendo.2013.204

Blander, J. M., Longman, R. S., Iliev, I. D., Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat Immunol*, 18(8), 851-860. doi: 10.1038/ni.3780

Borshoff, M. (1989). Effective communication tools for marketing your practice. *Indiana Med*, 82(6), 466-469.

Brown, M. A., Storlien, L. H., Huang, X. F., Tapsell, L. C., Else, P. L., Higgins, J. A., & Brown, I. L. (2010). Dietary Fat and Carbohydrate Composition: Metabolic Disease. In J. P. Montmayeur & J. le Coutre (Eds.), *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL).

Browne, H. P., Neville, B. A., Forster, S. C., & Lawley, T. D. (2017). Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nat Rev Microbiol*, 15(9), 531-543. doi: 10.1038/nrmicro.2017.50

Caesar, R., Reigstad, C. S., Backhed, H. K., Reinhardt, C., Ketonen, M., Lunden, G. O., Backhed, F. (2012). Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut*, 61(12), 1701-1707. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301689

Cao, H., Liu, X., An, Y., Zhou, G., Liu, Y., Xu, M., Wang, B. (2017). Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. *Sci Rep*, 7(1), 10322. doi: 10.1038/s41598-017-10835-8

Carey, F. (2006). *Química Orgánica (sexta edición ed.)*. Mexico Mc Graw Hill

Carlisle, E. M., & Morowitz, M. J. (2011). Pediatric surgery and the human microbiome. *J Pediatr Surg*, 46(3), 577-584. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.12.018

Carneville, J. (2005). Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat

in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42,(1), 110-115.

Charbonneau, M. R., Blanton, L. V., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., & Gordon, J. I. (2016). A microbial perspective of human developmental biology. *Nature*, 535(7610), 48-55. doi: 10.1038/nature18845

Claire Demenis, J. M. a. C. P. S. (2017). Sulfated Cholecystokin-8 Promotes CD36—Mediated Fatty Acid Uptake into Primary Mouse Duodenal Enterocytes. ORIGINAL RESEARCH, 8. doi: 10.3389/fphys.2017.00660

Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes*, 3(3), 186-202. doi: 10.4161/gmic.20168

D'Angelo, C., Reale, M., & Costantini, E. (2017). Microbiota and Probiotics in Health and HIV Infection. *Nutrients*, 9(6). doi: 10.3390/nu9060615

Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Clement, K. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426-436. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778

David L. Nelson, M. M. C. (2012). *Lehninger Principles of Biochemistry*: W. H. Freeman. de Zoete, M. R., & Flavell, R. A. (2013). Interactions between Nod-Like Receptors and Intestinal Bacteria. *Front Immunol*, 4, 462. doi: 10.3389/fimmu.2013.00462

Dias, M. F., Reis, M. P., Acurcio, L. B., Carmo, A. O., Diamantino, C. F., Motta, A. M., Nascimento, A. M. A. (2017). Changes in mouse gut bacterial community in response to different types of drinking water. *Water Res*, 132, 79-89. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.052

Diaz-Villasenor, A., Granados, O., Gonzalez-Palacios, B., Tovar-Palacio, C., Torre-Villalvazo, I., Olivares-Garcia, V., Tovar, A. R. (2013). Differential modulation of the functionality of white adipose tissue of obese Zucker (fa/fa) rats by the type of protein and the amount and type of fat. *J Nutr Biochem*, 24(11), 1798-1809. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.03.007

Ding, S., Chi, M. M., Scull, B. P., Rigby, R., Schwerbrock, N. M., Magness, S., Lund, P. K. (2010). High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal

inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*, 5(8), e12191. doi: 10.1371/journal.pone.0012191

Fava, F., Lovegrove, J. A., Gitau, R., Jackson, K. G., & Tuohy, K. M. (2006). The gut microbiota and lipid metabolism: implications for human health and coronary heart disease. *Curr Med Chem*, 13(25), 3005-3021.

Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*, 20(2), 145-155. doi: 10.1038/nn.4476

Gagliani, N., Palm, N. W., de Zoete, M. R., & Flavell, R. A. (2014). Inflammasomes and intestinal homeostasis: regulating and connecting infection, inflammation and the microbiota. *Int Immunol*, 26(9), 495-499. doi: 10.1093/intimm/dxu066

Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535(7610), 94-103. doi: 10.1038/nature18850

Glatz, J. F., & Luiken, J. J. (2017). From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie*, 136, 21-26. doi: 10.1016/j.biochi.2016.12.007

Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 367-377. doi: 10.1038/nrm2391

Guinane, C. M., & Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*, 6(4), 295-308. doi: 10.1177/1756283X13482996

Herrera, B. M., Keildson, S., & Lindgren, C. M. (2011). Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*, 69(1), 41-49. doi: 10.1016/j.maturitas.2011.02.018

Hodson L, McQuaid SE, Karpe F, Frayn KN, Fielding BA. Differences in partitioning of meal fatty acids into blood lipid fractions: a comparison of linoleate, oleate, and palmitate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Jan;296(1):E64-71.

Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., & Nicholson, J. K. (2012). Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab*, 16(5), 559-564. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.007

Honda, K., & Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75-84. doi: 10.1038/nature18848

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109(9), 1125-1131. doi: 10.1172/JCI15593

Hunt, R. H., & Yaghoobi, M. (2017). The Esophageal and Gastric Microbiome in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 46(1), 121-141. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.009

Jump, D. B., Thelen, A., Ren, B., & Mater, M. (1999). Multiple mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 60(5-6), 345-349.

Khan, T. J., Ahmed, Y. M., Zamzami, M. A., Mohamed, S. A., Khan, I., Baothman, O. A. S., Yasir, M. (2018). Effect of atorvastatin on the gut microbiota of high fat diet-induced hypercholesterolemic rats. *Sci Rep*, 8(1), 662. doi: 10.1038/s41598-017-19013-2

Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*, 17(1), 120. doi: 10.1186/s12866-017-1027-1

Kong, L. C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Clement, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity:

increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr*, 98(1), 16-24. doi: 10.3945/ajcn.113.058743

Koropatkin, N. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature reviews*, 10, 323-335.

Kraneveld, A. D., Szklany, K., de Theije, C. G., & Garssen, J. (2016). Gut-to-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders: Central Role for the Microbiome. *Int Rev Neurobiol*, 131, 263-287. doi: 10.1016/bs.irm.2016.09.001

Kusminski, C. M., Bickel, P. E., & Scherer, P. E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 15(9), 639-660. doi: 10.1038/nrd.2016.75

Lee, H. J., Choi, J. K., Ryu, H. S., Choi, C. H., Kang, E. H., Park, K. S., Hong, K. S. (2017). Therapeutic Modulation of Gut Microbiota in Functional Bowel Disorders. *J Neurogastroenterol Motil*, 23(1), 9-19. doi: 10.5056/jnm16124

Leslie, M. A., Cohen, D. J., Liddle, D. M., Robinson, L. E., & Ma, D. W. (2015). A review of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood triacylglycerol levels in normolipidemic and borderline hyperlipidemic individuals. *Lipids Health Dis*, 14, 53. doi: 10.1186/s12944-015-0049-7

Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), 11070-11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023. doi: 10.1038/4441022a

Lopomo, A., Burgio, E., & Migliore, L. (2016). Epigenetics of Obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 140, 151-184. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.02.002

Mackos, A. R., Maltz, R., & Bailey, M. T. (2017). The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *Horm Behav*, 88, 70-78. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.10.006

Miller M, Sorkin JD, Mastella L, Sutherland A, Rhyne J, Donnelly P, Simpson K, Goldberg AP. Poly is more effective than monounsaturated fat for dietary management in the metabolic syndrome: The muffin study. *J Clin Lipidol*. 2016 Jul-Aug;10(4):996-1003

Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C., & Alfenas Rde, C. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*, 108(5), 801-809. doi: 10.1017/S0007114512001213

Mosca A., Leclerc M., and Hugot J. P.. 2016. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front. Microbiol*. 7:455

Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto, S., Kuffa, P., & Kamada, N. (2016). Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res*, 14(2), 127-138. doi: 10.5217/ir.2016.14.2.127

Nelson, S., & Mason, C. M. (2000). The inflammatory response in chronic bronchitis. *Semin Respir Crit Care Med*, 21(2), 79-86. doi: 10.1055/s-2000-9842

Nepelska, M., de Wouters, T., Jacouton, E., Beguet-Crespel, F., Lapaque, N., Dore, J., Blottiere, H. M. (2017). Commensal gut bacteria modulate phosphorylation-dependent PPARgamma transcriptional activity in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep*, 7, 43199. doi: 10.1038/srep43199

Ooi, E. M., Watts, G. F., Ng, T. W., & Barrett, P. H. (2015). Effect of dietary Fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients*, 7(6), 4416-4425. doi: 10.3390/nu7064416

Ooi, E. M., Watts, G. F., Ng, T. W., & Barrett, P. H. (2015). Effect of dietary Fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients*, 7(6), 4416-4425. doi: 10.3390/nu7064416

Ooi, Y. P., Weng, S. J., Jang, L. Y., Low, L., Seah, J., Teo, S., . . . Sung, M. (2015). Omega-3 fatty acids in the management of autism spectrum disorders: findings from an open-label pilot study in Singapore. *Eur J Clin Nutr*, 69(8), 969-971. doi: 10.1038/ejcn.2015.28

Othman, F., Crooks, C. J., & Card, T. R. (2017). The risk of *Clostridium difficile* infection in patients with pernicious anaemia: a retrospective cohort study using primary care database. *United European Gastroenterol J*, 5(7), 959-966. doi: 10.1177/2050640617695697

Parks, E. J. (2001). Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. *J Nutr*, 131(10), 2772S-2774S.

Parks, E. J., Skokan, L. E., Timlin, M. T., & Dingfelder, C. S. (2008). Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J Nutr*, 138(6), 1039-1046. doi: 10.1093/jn/138.6.1039

Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gerard, P., Harach, T., Moser, M., Chou, C. J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*, 24(12), 4948-4959. doi: 10.1096/fj.10-164921

Rajagopala, S. V., Vashee, S., Oldfield, L. M., Suzuki, Y., Venter, J. C., Telenti, A., & Nelson, K. E. (2017). The Human Microbiome and Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 10(4), 226-234. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0249

Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123(11), 1939-1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939

Reilly, J. J., El-Hamdouchi, A., Diouf, A., Monyeki, A., & Somda, S. A. (2018). Determining the worldwide prevalence of obesity. *Lancet*, 391(10132), 1773-1774. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30794-3

Rial, S. A., Karelis, A. D., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2016). Gut Microbiota and Metabolic Health: The Potential Beneficial Effects of a Medium Chain Triglyceride Diet in Obese Individuals. *Nutrients*, 8(5). doi: 10.3390/nu8050281

Riccardi, G., Giacco, R., & Rivellese, A. A. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*, 23(4), 447-456. doi: 10.1016/j.clnu.2004.02.006

Rodrigues, K., Pereira, R. M., de Campos, T. D. P., de Moura, R. F., da Silva, A. S. R., Cintra, D. E., . . . de Moura, L. P. (2018). The Role of Physical Exercise to Improve the Browning of White Adipose Tissue via POMC Neurons. *Front Cell Neurosci*, 12, 88. doi: 10.3389/fncel.2018.00088

Rodriguez-Cruz, M., & Serna, D. S. (2017). Nutrigenomics of omega-3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors. *Nutrition*, 41, 90-96. doi: 10.1016/j.nut.2017.04.012

Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A. R., del Prado, M., & Torres, N. (2005). [Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids]. *Rev Invest Clin*, 57(3), 457-472.

Rogier, R., Evans-Marin, H., Manasson, J., van der Kraan, P. M., Walgreen, B., Helsen, M. M., Abdollahi-Roodsaz, S. (2017). Alteration of the intestinal microbiome characterizes preclinical inflammatory arthritis in mice and its modulation attenuates established arthritis. *Sci Rep*, 7(1), 15613. doi: 10.1038/s41598-017-15802-x

Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blottiere, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Obesity. (2017). Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control*, 28(3), 247-258. doi: 10.1007/s10552-017-0869-z

Sambolin-Escobales, L. (2016). A High Fat Diet Induces Decreased Levels of Colonic Tight Junctions and Inflammatory Cytokine Expression in Sprague Dawley Rats *FASEB J*.

Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2011). Nutritional influences on the gut microbiota and the consequences for gastrointestinal health. *Biochem Soc Trans*, 39(4), 1073-1078. doi: 10.1042/BST0391073

Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., . . . Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 15(1), 73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y

Sirisinha, S. (2016). The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 34(4), 249-264. doi: 10.12932/AP0803

Speakman, J. R. (2004). Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr*, 134(8 Suppl), 2090S-2105S. doi: 10.1093/jn/134.8.2090S

Sprecher, H., Luthria, D. L., Mohammed, B. S., & Baykousheva, S. P. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 36(12), 2471-2477.

Steimle, A., Gronbach, K., Beifuss, B., Schafer, A., Harmening, R., Bender, A., Frick, J. S. (2016). Symbiotic gut commensal bacteria act as host cathepsin S activity regulators. *J Autoimmun*, 75, 82-95. doi: 10.1016/j.jaut.2016.07.009

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., De Filippo, C. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, 5(1), 24. doi: 10.1186/s40168-017-0242-1

Sun, J., & Kato, I. (2016). Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes Dis*, 3(2), 130-143. doi: 10.1016/j.gendis.2016.03.004

Takiishi, T., Cook, D. P., Korf, H., Sebastiani, G., Mancarella, F., Cunha, J. P., Mathieu, C. (2017). Reversal of Diabetes in NOD Mice by Clinical-Grade Proinsulin and IL-10-Secreting *Lactococcus lactis* in Combination With Low-Dose Anti-CD3 Depends on the Induction of Foxp3-Positive T Cells. *Diabetes*, 66(2), 448-459. doi: 10.2337/db15-1625

Torres, N., I. Torre-Villalvazo and A. R. Tovar (2006). Future directions in reducing hepatic lipotoxicity. *Future Lipidol*, 1(3), 331-341.

Tovar, A. R., Diaz-Villasenor, A., Cruz-Salazar, N., Ordaz, G., Granados, O., Palacios-Gonzalez, B., Torres, N. (2011). Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arch Med Res*, 42(6), 540-553. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.10.004

Tremaroli, V., & Backhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249. doi: 10.1038/nature11552

Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol*, 587(Pt 17), 4153-4158. doi: 10.1113/jphysiol.2009.174136

Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol*, 587(Pt 17), 4153-4158. doi: 10.1113/jphysiol.2009.174136

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031. doi: 10.1038/nature05414

Unger, R. H., & Orci, L. (2001). Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J*, 15(2), 312-321. doi: 10.1096/fj.00-0590

Vazquez-Vela, M. E., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*, 39(8), 715-728. doi: 10.1016/j.arcmed.2008.09.005

Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol*, 65, 411-429. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102830

Weinstock, G. M. (2012). Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489(7415), 250-256. doi: 10.1038/nature11553

Wiktorowska-Owczarek, A., Berezinska, M., & Nowak, J. Z. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*, 24(6), 931-941. doi: 10.17219/acem/31243

Wong, S. H., Zhao, L., Zhang, X., Nakatsu, G., Han, J., Xu, W., Yu, J. (2017). Gavage of Fecal Samples From Patients With Colorectal Cancer Promotes Intestinal Carcinogenesis in Germ-Free and Conventional Mice. *Gastroenterology*, 153(6), 1621-1633 e1626. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.022

Wu, B. G., & Segal, L. N. (2017). Lung Microbiota and Its Impact on the Mucosal Immune Phenotype. *Microbiol Spectr*, 5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0005-2016

Xu, X., Jia, X., Mo, L., Liu, C., Zheng, L., Yuan, Q., & Zhou, X. (2017). Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone Res*, 5, 17046. doi: 10.1038/boneres.2017.46

Yang, T., Ahmari, N., Schmidt, J. T., Redler, T., Arocha, R., Pacholec, K., Zubcevic, J. (2017). Shifts in the Gut Microbiota Composition Due to Depleted Bone Marrow Beta Adrenergic Signaling Are Associated with Suppressed Inflammatory Transcriptional Networks in the Mouse Colon. *Front Physiol*, 8, 220. doi: 10.3389/fphys.2017.00220

Yao, X., Zhang, C., Xing, Y., Xue, G., Zhang, Q., Pan, F., Meng, G. (2017). Remodelling of the gut microbiota by hyperactive NLRP3 induces regulatory T cells to maintain homeostasis. *Nat Commun*, 8(1), 1896. doi: 10.1038/s41467-017-01917-2

Yazici, D., & Sezer, H. (2017). Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol*, 960, 277-304. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_12

Zhang, Y., & Liang, C. (2016). Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Sci China Life Sci*, 59(12), 1210-1217. doi: 10.1007/s11427-016-0325-6

Zheng, L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Schaefer, R., Lanis, J. M., Alexeev, E. E., Colgan, S. P. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *J Immunol*, 199(8), 2976-2984. doi: 10.4049/jimmunol.1700105

Cox, M. (Ed.). (2012). *Principles of biochemistry*. Freeman

Extracción de RNA

Limpiar el área de trabajo con etanol

Agregar 1ml de TRIzol® en un tubo ara Tissue Lyser

Colocar un balín de acero inoxidable

Los tejido se encuentran en el ultracongelador por lo que se deben colocar en nitrógeno líquido

Cortar 250 µg de tejido, colocar el tejido en el tubo para tissue lyser con trizol preparado en el punto 1

Colocar los tubos en el equipo Tissue lyser para homogeneizar la muestra a 300rpm

Sacar los tubos del equipo, agregar 200µl de cloroformo al 100%, y agitar en vortex

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente

Centrifugar a 10 000rpm durante 5 minutos

Recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Adicionar en proporción 1:1 de isopropanol al 100%

Mezclar por inversión e incubar 10 minutos a temperatura ambiente

Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos

Decantar el sobrenadante

Agregar 1 ml de etanol al 75% frío. Homogeinizar en vortex

Centrifugar a 10 000 rpm x 15 min.

Desechar el etanol por inversión y dejar secar el tubo en posición horizontal

Resuspender con 100µl e agua DEPC y homogeinizar en vortex

Calentar en 5 minutos, 65°C, homogeizar y mantener en hielo

Cuantificar en RNA en el Nanodrop®

Evaluar la integridad en el equipo de Qlaxen

Extracción de DNA para secuenciación

Se pesaron 250 mg de heces fecales

Se agrego 1.6 ml de buffer ASL

Se centrifugo a 10000 rpm durante, 5 min a temperatura ambiente

Colocar una tableta de inhibitex en el tubo eppendorf

Tomar 1.5 ml del sobrenadante obtenido

Homogenizar completamente en vortex

Centrifugar a 10 000rpm

Tomar 700µl el sobrenadante y trasnferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 ml

Centrifugar a 10000rpm x 3 min

Colocar en un tubo eppendorf de 2 ml, 25 µl de proteinasa K, agregar 600 µl de sobrenadante del paso 9. Agregar 600 µl de buffer AL

Incubar a 70°C POR 10 MIN

Agregar 600 µl de etanol al 100% frío. Homogeneizar en vortex

Pasar el sobrenadante a través e una de las dos columnas para retención de ADN mediante centrifugación (10 000 rpm)

Lavar con 500 μ l de buffer AW1. Centrifugar a 10 000 rpm
Lavar con 500 μ l de buffer AW2. Centrifugar a 10 000 rpm
Dejar secar todo el buffer residual mediante centrifugación a 10000 rpm
Colocar la columna en un tubo nuevo para centrifuga e 1.6 ml agregar 200 μ l e
buffer AE 1x
Dejar incubar durante 20 minutos
Centrifugar durante 1 minuto 10 000 rpm para eluir y colectar el ADN
Conservar el ADN colectado a -70°C
Cuantificar el dna obtenido mediante nanodrop