



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA

“ASOCIACIÓN ENTRE EL TIPO DE LÍPIDOS INGERIDOS EN LA DIETA Y EL PERFIL DE CERAMIDAS
CIRCULANTES Y EN TEJIDO MUSCULAR Y SU EFECTO SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA
EN SUJETOS ADULTOS”

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
M EN SP. JORGE MALDONADO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARDIA LÓPEZ ALARCÓN
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA
LABORATORIO DE NUTRIGENÓMICA Y NUTRIGENÉTICA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES METABÓLICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICA Y NUTRICIÓN

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2019



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.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Av. Cuauhtémoc No. 330 Col. Doctores, C. P. 06720, Ciudad de México. Teléfono: 56 27 69 00, extensión: 22483. Con recursos económicos de:

- Fondo Sectorial en Salud de CONACYT (número de solicitud: 0261774).
- Fondo de Investigación en Salud del IMSS (número de registro): FIS/IMSS/PROT/G15/1452.

D e d i c a t o r i a

*“Como esta vida que no es mía
Y sin embargo es la mía,
Como ese afán sin nombre
Que no me pertenece y sin embargo soy yo”.*

Luis Cernuda.

**A mis hijos, Santiago y Antonio,
a mis hermanos, Maru y Alex,
a mis padres, Celsa y Jorge.
...a sobrin@ bebé.**

Por todo su apoyo y sus contribuciones a mi vida profesional y académica, a la Maestra Irene Montalvo Velarde, Dr. Salvador Villalpando Hernández, Dra. Martha del Prado Manríquez y Dra. Mardia López Alarcón: con gratitud y admiración, siempre.

A todos mis alumnos, colaboradores y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición que durante años nos hemos acompañado en este arduo camino de la investigación científica. Gracias.

Í N D I C E G E N E R A L

Contenido	Página
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Esfingolípidos y ceramidas.	2
2.2 Metabolismo de las ceramidas.	4
2.3 Sensibilidad a la insulina.	7
2.4 Ceramidas y Sensibilidad a la insulina.	11
2.5 Lípidos de la dieta.	15
2.6 Determinación de la ingesta lipídica.	19
2.7 Biomarcadores de la ingesta lipídica.	22
2.8 Ceramidas y lípidos de la dieta.	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. OBJETIVOS	29
6. HIPOTESIS	30
7. MATERIAL Y MÉTODOS	31
7.1 Diseño de estudio.	31
7.2 Población de estudio.	31
7.3 Tamaño de muestra.	32
7.4 Protocolo de estudio.	32
7.5 Determinación de la ingesta lipídica.	35
7.6 Determinaciones bioquímicas.	36
7.7 Determinación de la actividad física.	40
7.8 Análisis estadístico	41
7.9 Aspectos éticos.	41
8. RESULTADOS	43
9. DISCUSIÓN	59
10. CONCLUSIONES	70
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICOS	76
AGRADECIMIENTOS	77

Í N D I C E D E C U A R O S Y F I G U R A S

Contenido	Página
Figura 1. Estructura química de una ceramida.	3
Figura 2. Biosíntesis de Ceramidas.	6
Cuadro 1. Ventajas y desventajas de los métodos para evaluar sensibilidad a la insulina.	10
Figura 3. Mecanismos que afectan la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa en los tejidos insulino- dependientes debido al incremento intracelular de ceramidas.	14
Cuadro 2. Familias lipídicas de los alimentos y sus ácidos grasos más abundantes y/o representativos.	17
Cuadro 3. Comparación de diversas características de los principales instrumentos de evaluación dietaria.	21
Cuadro 4. Comparación del perfil de familias lipídicas en músculo, eritrocitos y suero de sujetos adultos metabólicamente sanos	25
Figura 4. Procedimiento de extracción y purificación de ceramidas plasmáticas.	37
Figura 5. Procedimiento de extracción y purificación de ceramidas plasmáticas.	38
Cuadro 5. Iones de transición de las ceramidas estudiadas.	40
Cuadro 6. Características antropométricas y bioquímicas de la población de estudio.	43
Figura 6. Proporción de sujetos estratificados por nivel de actividad física.	44
Cuadro 7. Ingesta de macronutrientes y tipo de lípidos de la dieta de la población estudiada.	45
Figura 7. Proporción de sujetos estratificados por nivel de adecuación de ingesta de energía y macro nutrimentos.	46

INDICE DE CUAROS Y FIGURAS (CONTINUACIÓN)

Contenido	Página
Figura 8. Proporción de sujetos estratificados por nivel de adecuación de ingesta de familias lipídicas.	48
Figura 9. Concentraciones de ceramidas plasmáticas (A) y en tejido muscular (B) de baja y alta concentración.	49
Cuadro 8. Correlación entre macronutrientes y tipo de lípidos ingeridos en la dieta versus concentraciones de ceramidas plasmáticas.	50
Cuadro 9. Modelos de regresión lineal múltiple para distintas ceramidas e ingesta de ácidos grasos omega-3 o relación Ω -6/ Ω -3 ajustando por ingesta de hidratos de carbono o azúcares simples.	52
Cuadro 10. Correlación entre macronutrientes y tipo de lípidos ingeridos en la dieta versus concentraciones de ceramidas en tejido muscular.	53
Cuadro 11. Asociación entre la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular.	54
Cuadro 12. Efecto de las ceramidas plasmáticas sobre la sensibilidad a la insulina.	55
Cuadro 13. Efecto de las ceramidas plasmáticas sobre la sensibilidad a la insulina.	56
Cuadro 14. Correlación entre las concentraciones de ceramidas plasmáticas y otras variables bioquímicas.	57
Cuadro 15. Correlación entre las concentraciones de ceramidas en tejido muscular y otras variables bioquímicas.	58

1. RESUMEN.

Antecedentes: los ácidos grasos son constituyentes estructurales de las ceramidas. El tipo de lípidos ingeridos en la dieta podría estar relacionado estrechamente con el perfil de ceramidas presentes en plasma y tejido muscular. Estos compuestos se han visto implicados en alteraciones de la función de la insulina para la captación celular de glucosa. **Objetivo:** determinar la asociación entre el tipo de lípidos ingeridos en la dieta y el perfil de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular y su relación con la sensibilidad a la insulina en adultos eutróficos y aparentemente sanos. **Material y Métodos:** se reclutaron sujetos eutróficos y metabólicamente sanos. Se cuantificó la ingesta dietaria mediante un diario de registro de alimentos de 3 días. Posteriormente se colectó una biopsia de tejido muscular del vasto lateral del cuádriceps derecho y se realizó un Clamp HE con una infusión de glucosa al 20% y una hiperinsulinemia constante de $80 \mu\text{UI}/\text{m}^2 \cdot \text{min}$. Del análisis de la dieta se obtuvo el promedio correspondiente de la ingesta total de energía, los macronutrientes y las diferentes familias lipídicas (g/día). Se cuantificaron diversas ceramidas en plasma y tejido muscular por UPLC-MS/MS. **Resultados:** Se reclutaron 34 sujetos. No se observó asociación entre la ingesta de grasa saturada y monoinsaturada y las ceramidas plasmáticas y de tejido muscular. Sin embargo, se obtuvieron correlaciones inversas entre la ingesta de omega-3 y las ceramidas plasmáticas C14:0, C18:1 y C18:0 ($r_s \sim 0.38$). Con la relación $\Omega-6/\Omega-3$ hubo una asociación directa con las ceramidas recién mencionadas además de las ceramidas C16:0 y C20:0 ($r_s \sim 0.4$). Sólo la ceramida C18:0 de tejido muscular se asoció inversamente con la ingesta de grasa total y las otras familias lipídicas. Por otra parte, las ceramidas C18:0 y C20:0 de plasma y las ceramidas C18:1 y C20:0 de músculo se asociaron inversamente con la sensibilidad a la insulina ($r_s > 0.4$). Después de ajustar por la actividad física mantuvieron su efecto las ceramidas plasmáticas y la ceramida C20:0 de músculo. **Conclusiones:** la ingesta de ácidos grasos omega-3 se asoció inversamente con las concentraciones plasmáticas de algunas ceramidas y directamente con la relación $\Omega-6/\Omega-3$. Las ceramidas plasmáticas C18:1 y C20:0 y la ceramida C20:0 de tejido muscular, están fuertemente relacionadas con una disminución en la sensibilidad a la insulina incluso en sujetos eutróficos y metabólicamente sanos. Adecuaciones en la ingesta lipídica, orientada sobre todo hacia un mayor consumo de ácidos grasos omega-3 y un consumo equilibrado de ácidos grasos omega-6 en la dieta, podría tener un efecto favorable sobre la sensibilidad a la insulina por vía de las ceramidas.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Esfingolípidos y ceramidas.

La variedad de lípidos presentes en las células eucariotas podría explicarse por su participación en numerosos procesos biológicos de gran importancia para los seres vivos. Los lípidos son en primera instancia, reservorios de energía altamente eficientes constituidos principalmente por triacilgliceroles (TAG). En segundo lugar, la propiedad anfipática de los lípidos, es fundamental para la formación de las bicapas lipídicas presentes en las membranas y otros organelos celulares; además de su función física de barrera, los lípidos favorecen las reacciones químicas y la transmisión de señales que son esenciales para los procesos de la vida celular. Finalmente, los lípidos pueden actuar como primeros y segundos mensajeros en los procesos de transducción y reconocimiento de señales [1].

Los lípidos más abundantes en las estructuras de las membranas celulares son los glicerofosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfático). Se estima que la fosfatidilcolina representa el 50% del total de éstos; la particularidad estructural de este compuesto, que se caracteriza por su forma casi cilíndrica, facilita la interacción de su porción polar y no polar en el microambiente celular [1]. Otros componentes de importancia en las membranas celulares son los esfingolípidos, de ellos, la esfingomielina es el componente más abundante. La estructura base de estos compuestos son las ceramidas que están constituidas por un ácido graso y una esfingosina (2-amino-1,3-dihidroxi alcano) unidas mediante un enlace amida (Figura 1).

El término “ceramida” se utiliza comúnmente para nombrar a las N-acilesfingosinas. No obstante, este nombre genérico no permite distinguir el grupo acilo que forma parte de

la estructura central de las ceramidas. Este grupo acilo es un ácido graso, la mayoría de las veces saturado o monoinsaturado, típicamente de 14 a 26 carbonos de longitud. Por ello, la nomenclatura correcta para identificar el grupo acilo que conforma la estructura central de la ceramida, es Cer C16:0 para la N-palmitoil-esfingosina o Cer C18:0 para la ceramida constituida por un ácido graso saturado de 18 carbonos conocido trivialmente como ácido esteárico [2].

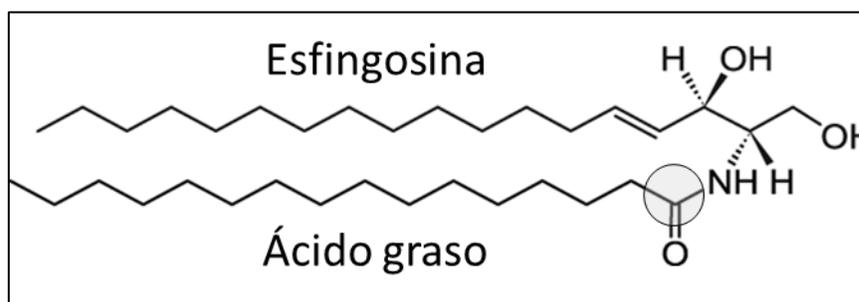


Figura 1. Estructura química de una ceramida. Se muestra el derivado de esfingosina unido a un ácido graso saturado de 16 carbonos mediante un enlace amida (en círculo gris).

Recientemente se ha demostrado que la acumulación de ceramidas en hígado, músculo, tejido adiposo y páncreas, contribuye al desarrollo de diversos trastornos metabólicos como la aterosclerosis, la resistencia a la insulina, la disfunción de la célula β pancreática, el hígado graso no alcohólico, e incluso, algunos tipos de cáncer [2]. El estudio de las ceramidas ha adquirido relevancia por su relación con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas de gran importancia en el contexto de la salud poblacional.

2.2 Metabolismo de las ceramidas.

Las ceramidas ocupan un lugar central en la biosíntesis y catabolismo de otros esfingolípidos; pueden ser sintetizadas de *novo*, por la hidrólisis de esfingomielinas y una vía de recuperación a partir de lípidos más complejos (Figura 2). La síntesis de *novo* de las ceramidas inicia con la condensación de una molécula de serina y una cadena de palmitoil-CoA, que es catalizada por la enzima serina-palmitoiltransferasa (Ser-PT; EC 2.3.1.50) para formar 3-ceto-esfinganina. Esta enzima es altamente selectiva para ácidos grasos saturados de 16 ± 1 carbonos, por lo que la velocidad de esta reacción está influenciada por la disponibilidad de este sustrato. Esto explica por qué los lípidos saturados de cadena media están estrechamente relacionados con la biosíntesis de las ceramidas y otros esfingolípidos. El intermediario 3-ceto-esfinganina es reducido rápidamente a esfinganina por acción de la 3-ceto-esfinganina reductasa (Ceto-ER; EC 1.1.1.120) dependiente de NADPH. La esfinganina se condensa con un segundo ácido graso para formar una molécula de dihidroceramida en una reacción catalizada por la enzima ceramida sintasa (CerS; 2.4.1.92). Estudios recientes han demostrado que existen una gran variedad de isoformas de la CerS que presentan una afinidad selectiva por diferentes ácidos grasos y que varían de acuerdo con el tipo de tejido y muy probablemente con la función que desempeñan en éste. Los ácidos grasos más abundantes en las ceramidas presentes en tejido muscular y adiposo son los siguientes: lignocérico (C24:0), nervónico (C24:1), esteárico (C18:0), palmítico (C16:0) y palmitoléico (C16:1). Finalmente, la dihidroceramida es una molécula inactiva que por la acción de la dihidroceramida desaturasa (DCD; EC 1.14.19.1) es oxidada a su forma activa y final, la ceramida [3].

La biosíntesis de ceramidas a partir de la esfingomielina adquiere relevancia en el contexto de la obesidad y la inflamación. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina proinflamatoria que incrementa su concentración en presencia de mayor adiposidad corporal y se sabe que activa a la esfingomielinasa (EMasa) que hidroliza el enlace fosfodiéster de la esfingomielina. Se han descrito diversas isoformas de la EMasa que pueden distinguirse por su pH óptimo de trabajo. La esfingomielinasa neutra (EMasa-N) y ácida (EMasa-A) se activan rápidamente por diversos estímulos de estrés y promueven un aumento en los niveles de ceramidas de la membrana celular durante un período de minutos e incluso de horas. Existe una variedad alcalina de la esfingomielinasa que se encuentra en la mucosa intestinal y la bilis y que al parecer no participa en procesos de transducción de señales [4].

Además del TNF- α , otros compuestos como las especies reactivas de oxígeno (ERO), la interleucina-1 β y los ácidos grasos libres pueden inducir una generación sostenida y prolongada de ceramidas. Este fenómeno explica en parte, el incremento de las concentraciones de ceramidas circulantes y otros tejidos del organismo observado en presencia de obesidad, dislipidemias, hígado graso no alcohólico y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [3].

Finalmente, las ceramidas pueden ser recicladas a través de la enzima ceramida sintasa (CS) a partir de la esfingosina generada por el catabolismo de esfingolípidos más complejos. Si bien las ceramidas pueden producirse eventualmente en todos los tejidos del organismo, se considera que el hígado es un sitio clave para su producción. En la Figura 2 se

muestra un resumen de la biosíntesis de ceramidas a través de 3 vías metabólicas mencionadas anteriormente.

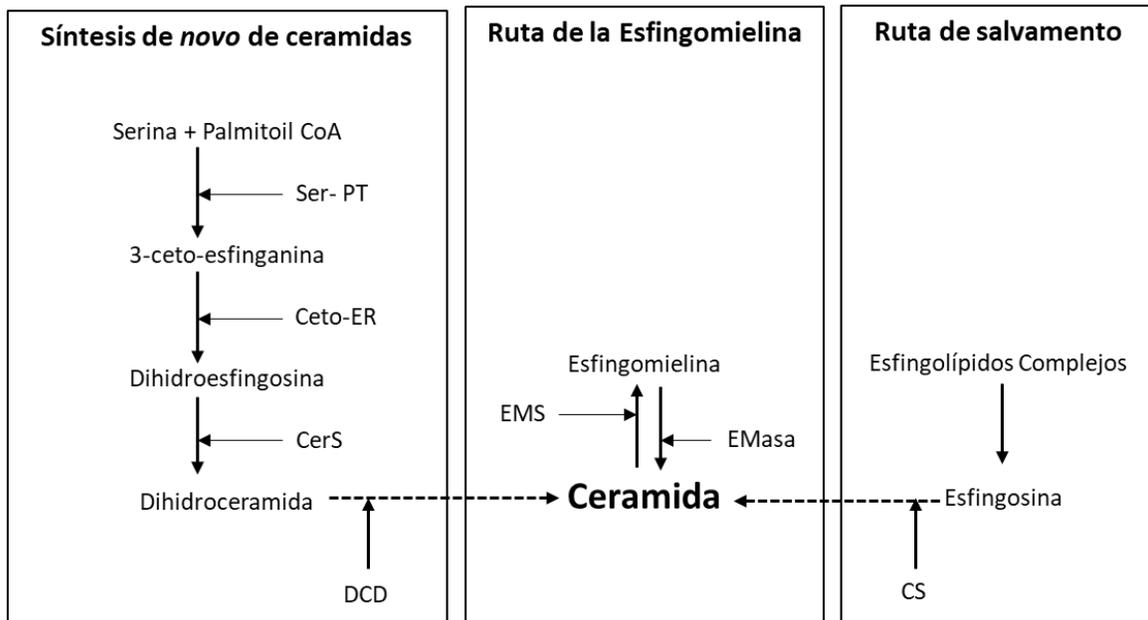


Figura 2. Biosíntesis de Ceramidas. Abreviaturas: Ser-PT= serina-palmitoiltransferasa; Ceto-ER= 3-ceto-esfinganinareductasa; CerS= ceramida sintasa; DCD= dihidroceramida desaturasa; EMS= esfingomielina sintasa; EMasa= esfingomielinasa; CS= ceramida sintasa [3].

2.3 Sensibilidad a la insulina.

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células beta pancreáticas ubicadas en los islotes de Langerhans. Desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético ya que regula la captación de glucosa por los tejidos insulino-dependientes (tejido adiposo y tejido muscular), incrementa la síntesis de glucógeno hepático y en músculo, suprime la síntesis hepática de glucosa, aumenta la síntesis de proteínas y captación de aminoácidos y regula mecanismos de expresión genética. Si bien todas estas funciones son de gran importancia en el organismo, la regulación de los niveles de glucemia sanguínea resulta muy relevante en el contexto de las enfermedades relacionadas a las alteraciones en el metabolismo de la glucosa como el síndrome metabólico, las dislipidemias, el HGNA y la DM2. La ruptura en el equilibrio de la relación glucosa-insulina es considerado uno de los principales factores etiológicos para el desarrollo de estas enfermedades y es la base de los métodos diagnóstico utilizados para evaluar alteraciones tempranas en el metabolismo de este carbohidrato [5].

La sensibilidad a la insulina (SI) se define como la capacidad biológica de esta hormona para realizar su función. Se considera que una persona tiene una sensibilidad adecuada cuando los mecanismos de fosforilación y traslocación del transportador Glut 4 se realizan de manera eficiente en las células de los tejidos insulino-dependientes. El incremento de la adiposidad corporal y de moléculas de carácter inflamatorio impactan negativamente sobre estos mecanismos que se traducen en una elevación moderada y progresiva de las concentraciones de glucosa circulante. En el tejido hepático se favorece la disminución de la síntesis de glucógeno y el incremento en la liberación de glucosa al

torrente sanguíneo. En respuesta a esta elevación parcial en los niveles de glucosa, el páncreas tiene una función compensatoria: aumenta la secreción de insulina para reestablecer las concentraciones de glucosa sanguínea a niveles normales. La resistencia a la insulina (RI), concepto antagónico al de sensibilidad a la insulina, se caracteriza por un incremento en las concentraciones de insulina circulante [5].

Existen numerosos métodos para evaluar el grado de sensibilidad a la insulina en una persona; se puede medir directamente si se evalúa la respuesta fisiológica a la acción de una infusión exógena de insulina que promueve la captación de glucosa en los tejidos insulino dependientes o, de manera indirecta, a través de la relación glucosa-insulina en ayuno o después de haber recibido un estímulo por vía oral o intravenosa. Los métodos directos son más precisos, pero también son más invasivos y complejos de realizar, que dificultan su aplicación en la práctica clínica. El método de referencia para determinar la sensibilidad a la insulina es el pinzamiento (*Clamp*) hiperinsulinémico-euglicémico (Clamp HE) descrito por Ralph DeFronzo en 1979 [6, 7]. El fundamento de este método consiste en cuantificar el volumen requerido de una infusión de glucosa intravenosa al 20% ($\text{mg/kg} \cdot \text{min}$) para mantener niveles constantes de glucemia sanguínea a 90 mg/dl durante 30 minutos (euglicemia), en un estado de hiperinsulinemia constante ($80 \mu\text{UI/m}^2 \cdot \text{min}$) [7]. Dada la complejidad del Clamp HE se han desarrollado otros métodos más simples; probablemente el más difundido en estudios de investigación y en el ámbito clínico sea el índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) propuesto por Mathews en 1985. Este índice se calcula a partir del producto de las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina en ayuno entre un valor constante de 405 cuando la

glucosa se expresa en mg/dl o de 22.5 cuando se expresa en mmol/l [6]. Hasta la fecha se han publicado diversos puntos de corte para el diagnóstico de RI mediante el índice HOMA en diversas poblaciones, grupos de edad y sexo. Por citar un ejemplo, un trabajo realizado por Aradillas *et al* en el 2012, reportó valores percentilados para el índice HOMA en una muestra de 3701 niños y adolescentes de cuatro estados del centro y norte del país [8].

Dado que el rasgo más característico de la RI es el hiperinsulinismo compensatorio, las concentraciones elevadas de insulina en ayuno también son un buen indicador de este trastorno metabólico. No obstante, diversos autores han discutido sobre la necesidad de contar con índices derivados de una curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO) o estímulos suministrados por vía intravenosa para evaluar la respuesta pancreática y de los tejidos insulino-dependientes en un escenario postprandial. En comparación con los índices basados en el ayuno, estos métodos requieren de múltiples tomas de muestra sanguíneas si se desean evaluar las dos fases de secreción de insulina: fase rápida (0 a 10 minutos) y segunda fase (a partir de los 10 minutos posteriores a la ingesta de un reto). Los índices derivados de una CTGO se construyen a partir de las mediciones simultáneas de glucosa e insulina en los diferentes tiempos en que se toma la muestra. El índice de sensibilidad a la insulina compuesto (ISI compuesto), propuesto por Matsuda y DeFronzo en 1999, correlacionó favorablemente con el Clamp HE ($r=0.73$) [9]. En el cuadro 1 se muestran los métodos directos e indirectos más utilizados y difundidos con sus principales ventajas y desventajas.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de los métodos para evaluar sensibilidad a la insulina. Adaptado y modificado de Azucena Martínez *et al* [5].

Métodos directos		
	Ventajas	Desventajas
Clamp HE	Método de referencia para determinar SI periférica.	Son métodos invasivos que requieren de personal altamente capacitado y una infraestructura adecuada para realizarse. Son escasos los puntos de corte con fines diagnóstico.
Clamp Hiperglucémico	Método de referencia para determinar funcionalidad de la célula β pancreática (secreción de insulina).	
Métodos indirectos (ayuno)		
	Ventajas	Desventajas
Insulina ayuno HOMA-IR QUICKI	Sólo requieren de una punción venosa para realizarse. Correlacionan moderadamente con el Clamp HE. Existen puntos de corte disponibles para distintas poblaciones por grupos de edad y sexo.	La insulina en ayuno ha reportado alta variabilidad intra-sujeto.
Métodos indirectos (post-estimulo de glucosa)		
	Ventajas	Desventajas
ISI compuesto Insulina de 120 minutos	Correlaciona mejor que los índices basados en el ayuno contra el Clamp HE. Es menos invasivo que los métodos directos.	En comparación con los métodos basados en el ayuno se requiere de múltiples muestreos y determinaciones.

Abreviaturas: HOMA: (por su nombre en inglés *Homeostasis Model Assessment*); QUICKI: (por su nombre en inglés *Quantitative Insulin Check Index*= $1 / (\log \text{ glucosa plasmática en ayuno} + \log \text{ insulina plasmática en ayuno})$); ISI compuesto: índice de sensibilidad a la insulina compuesto= $10000 / \sqrt{(\text{glucosa plasmática en ayuno} * \text{insulina plasmática en ayuno}) * (\text{promedio glucosa post carga} * \text{promedio insulina post carga})}$.

2.4 Ceramidas y Sensibilidad a la insulina.

Diversos estudios han demostrado que la presencia de ceramidas en diferentes tejidos biológicos tiene un efecto adverso sobre la sensibilidad a la insulina. En un estudio realizado por Strackzowsky *et al* [10] en 27 sujetos adultos sin obesidad y con tolerancia normal a la glucosa, se observó que el contenido total de ceramidas presentes en el músculo, explicaban el 24% de la variabilidad de la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE ($P=0.001$). Por otra parte, Adams y colaboradores reportaron que sujetos obesos con RI contenían el doble de ceramidas intramiocelulares en comparación con un grupo control (46.9 vs. 25.2 pmol/mg músculo, $P<0.05$; respectivamente) [11]. Finalmente, en otro trabajo publicado por Amati [12] y colaboradores se comparó el perfil de ceramidas y esfingolípidos en biopsias de músculo esquelético (vasto lateral) de adultos mayores (>60 años de edad) estratificados en tres diferentes grupos de estudio (atletas, sujetos de peso normal y sujetos con obesidad). El estudio reveló que el grupo de sujetos con obesidad contenía una mayor proporción de ceramidas totales en músculo ($P<0.01$). Asimismo, las subespecies Cer C18:1, Cer C24:0 y Cer C24:1 fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con obesidad. Los perfiles de ceramidas que se asociaron inversamente con la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE, fueron los factores 1 (Cer C24:0, Cer C24:1, Cer C18:0, Cer C20:0) y 2 (Cer C16:0 y Cer C16:1) con coeficientes de correlación significativos de $r= -0.46$ y $r= -0.47$, respectivamente. El factor 4 (Dihidroceramida C16 y C14:0) se asoció con mayor sensibilidad a la insulina ($r=0.38$, $P<0.05$) y el factor 3 (Cer C16:0) no reportó significancia estadística.

Recientemente en un trabajo publicado por Kasumov *et al* en 24 adultos (14 con tolerancia normal a la glucosa y 10 con DM2) que fueron sometidos a un programa de ejercicio de 12 semanas, se reportó un decremento significativo en las ceramidas totales y en la ceramida C14:0; este decremento en las concentraciones de ceramidas plasmáticas y de la ceramida C14:0 se asoció inversamente con un incremento en la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE ($r=-0.51$, $P=0.02$ y $r=-0.56$, $P=0.009$), respectivamente [13].

Se han sugerido algunos mecanismos para explicar el efecto de las ceramidas sobre la actividad de la insulina en tejidos insulino dependientes. La acumulación intracelular de ceramidas en estos tejidos inhibe la acción de la proteína cinasa B (PKB), un intermediario clave en la regulación del metabolismo de la glucosa, a través de dos mecanismos (Figura 3). El primero de ellos está relacionado con la desfosforilación de PKB en la unidad serina 473 (Ser 473) vía la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La forma activa de la PKB requiere que esta unidad se encuentre fosforilada para activar la traslocación del transportador Glut 4 hacia la membrana celular y permitir la entrada de glucosa al interior de la célula. El segundo mecanismo está relacionado con la fosforilación de PKB en la unidad treonina 34 (Tre 34) por medio de una proteína cinasa C atípica (isoforma ζ) que interfiere con su capacidad para unirse a los fosfoinositoides membranales [14]. Adicionalmente, un trabajo reciente publicado por Hassan *et al* demostró que la acumulación de ceramidas en tejido músculo esquelético impacta la actividad de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) a través de una proteína cinasa dependiente de ARN (PKR). La activación de PKR fosforila el substrato

receptor de insulina-1 (IRS-1) inhibiendo su capacidad para reclutar y activar a PI3K que a su vez afecta la activación de PKB (Figura 3) [15].

Considerando estas reacciones y mecanismos en su conjunto, podría resumirse que la acumulación intracelular de ceramidas promueve la inactivación de PKB, un intermediario clave que promueve la traslocación del transportador Glut 4 para permitir la entrada de glucosa a las células de los tejidos insulino dependientes. Este fenómeno conlleva en el largo plazo a una afectación en los mecanismos de señalización de la insulina que promueve un incremento de su secreción y una disminución en la captación de glucosa, rasgo característico de una disminución en la SI.

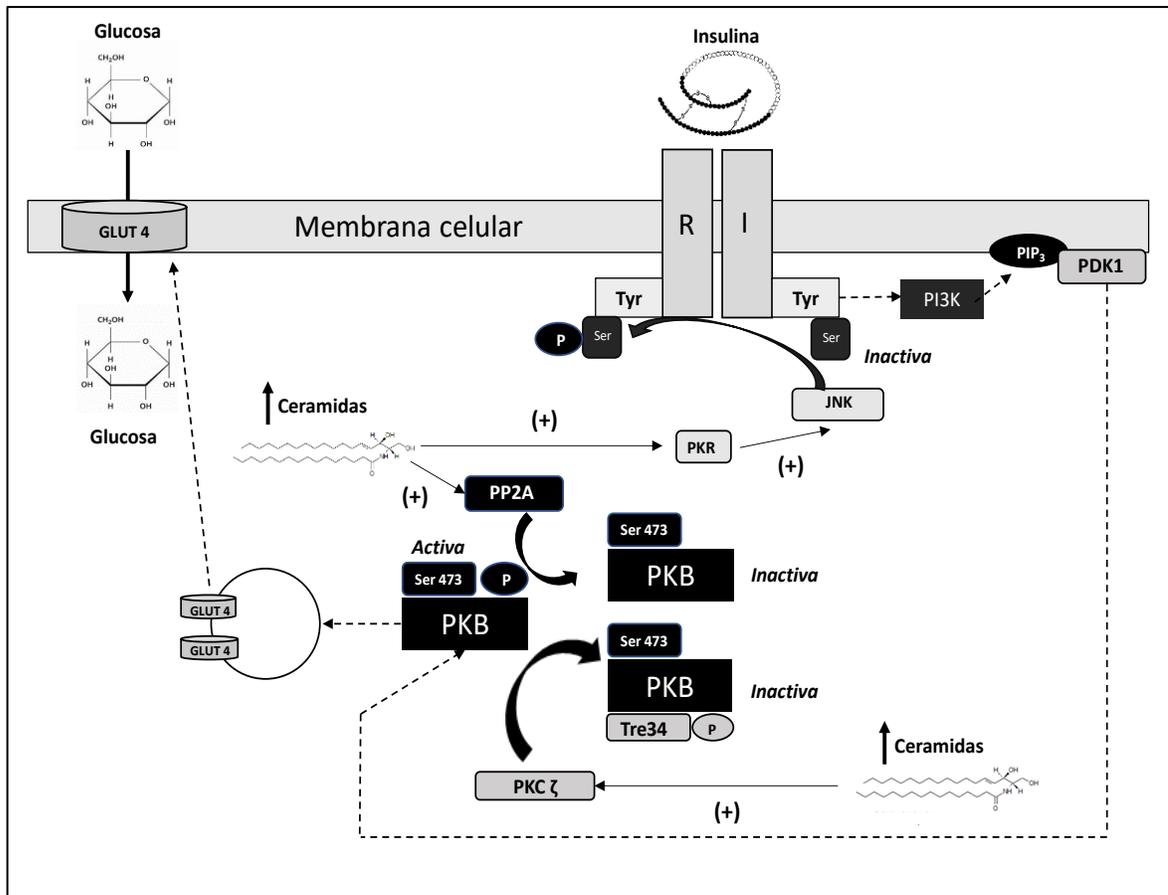


Figura 3. Mecanismos que afectan la señalización de la insulina y el metabolismo de la glucosa en los tejidos insulino dependientes debido al incremento intracelular de ceramidas. Ilustración adaptada y modificada de Aburasayn et al [14]. Abreviaturas: PKB= Proteína cinasa B; Ser 473= Serina 473; Treonina 34= Tre 34; PKC ζ= proteína cinasa C ζ; PP2A= proteína fosfatasa 2A; PKR= proteína cinasa dependiente de ARN; JNK= c-Jun amino terminal cinasa; RI= receptor de insulina; PI3K= fosfatidil inositol 3-cinasa; PIP₃= fosfatidil inositol 3 trifosfato; PDK1= fosfoinositoide dependiente de cinasa.

2.5 Lípidos de la dieta.

Las moléculas de naturaleza lipídica más abundantes en los alimentos consumidos por los seres humanos están presentes en forma de triacilgliceroles; constituidos por una molécula de glicerol y 3 ácidos grasos con longitud y grado de insaturación variables. Si bien en los alimentos existen numerosos tipos de ácidos grasos (AG), con la intención de simplificar la información, podríamos considerar que los más importantes por su abundancia (mayor al 0.1% con respecto al total de AG) son aproximadamente 20 [16]. En el contexto de la nutrición y la salud, los ácidos grasos se agrupan en familias que hacen referencia a su tipo y grado de insaturación. En cuadro 2 se muestran estas familias lipídicas con los AG más abundantes y/o representativos que las conforman. Si bien existen ácidos grasos de cadena impar, algunos de ellos relativamente abundantes en determinados alimentos, estos no son considerados en el balance nutricional por no tener actividad biológica [16].

En los últimos años se ha demostrado que el tipo de grasa consumida en la dieta es más determinante para el desarrollo de una enfermedad cardiovascular (ECV) que la cantidad de grasa ingerida. Existe evidencia sólida que la grasa saturada (GS) y la grasa trans (GT) incrementan el riesgo cardiovascular (RCV). Por el contrario, la grasa monoinsaturada (GMI), presente de manera abundante en el aceite de oliva, y la grasa poliinsaturada (GPI), particularmente la de la familia omega-3, tienen un efecto protector contra el RCV. Asimismo, se ha sugerido que la relación Omega-6/Omega-3 resulta un factor protector de RCV cuando se encuentra entre las proporciones 5:1 a 10:1 [17, 18].

Dado que el consumo balanceado de los lípidos de la dieta es favorable para la salud de los individuos, se han sugerido niveles de adecuación con base en la ingesta total de

energía (ITE). En el caso de los adultos, la distribución porcentual de macronutrientes de una dieta equilibrada y saludable de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la siguiente: hidratos de carbono= 55-60%, lípidos 15-30% y proteínas= 15-20% de la ITE. En el caso de las familias lipídicas se han sugerido niveles de adecuación de ingesta para GS menores al 10%, GPI entre el 6% y 10% (5 a 8% de Omega-6 y 1 a 2% de Omega-3), GT menor al 1% y GMI de aproximadamente el 10% (este componente lipídico se utiliza para ajustar la adecuación de los requerimientos de grasa total); todos estos porcentajes de adecuación son de acuerdo a la ITE [17].

Cuadro 2. Familias lipídicas de los alimentos y sus ácidos grasos más abundantes y/o representativos [16].

Familia Lipídica	Nombre Trivial	Fórmula Química Condensada	
Grasa Saturada (GS)	Ácido Caprílico	C8:0	
	Ácido Cáprico	C10:0	
	Ácido Láurico	C12:0	
	Ácido Mirístico	C14:0	
	Ácido Palmítico	C16:0	
	Ácido Esteárico	C18:0	
	Ácido Araquídico	C20:0	
	Ácido Behénico	C22:0	
Grasa Monoinsaturada (GMI)	Ácido Lignocérico	C24:0	
	Ácido Miristoleico	C14:1	
	Ácido Palmitoleico	C16:1	
	Ácido Oleico	C18:1n-9	
Grasa Trans (GT)	Ácido Nervónico	C24:1n-9	
	Ácido Elaídico*	C18:1n-9t	
Grasa Poliinsaturada (GPI)	Ácido Linolelaídico*	C18:2n-6t	
	Omega-3	Ácido Linolénico*	C18:3n-3
		Ácido Eicosapentaenoico	C20:5n-3
Ácido Docosahexaenoico		C22:6n-3	
Omega-6	Ácido Linoleico*	C18:2n-6	
	Ácido Araquidónico	C20:4n-6	

Nomenclatura de fórmula química condensada= C (número de carbonos): (número de dobles enlaces en la estructura) (tipo de familia de acuerdo a la ubicación del primer doble enlace con respecto al grupo metilo). *Ácidos grasos esenciales.

La ingesta de lípidos en la dieta mexicana podría tener ciertas particularidades debido al tipo y contenido de grasa de los productos comercializados en el mercado y las prácticas de elaboración de los alimentos. Por ello es factible considerar que el perfil de consumo lipídico de la población mexicana podría ser diferente al de otras poblaciones del mundo. En el libro “Grasas, dieta y salud” del doctor Salvador Villalpando y colaboradores, se reporta el perfil detallado de AG de 261 alimentos mexicanos [16]. Estos alimentos se seleccionaron de acuerdo con la información dietaria recabada en la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999 que fueron consumidos por más del 5% de la población, además de que contribuyeron con más del 80% de la ingesta de grasa recomendada. Esta información ha sido de gran utilidad para actualizar sistemas y bases de datos utilizados para realizar análisis de los patrones dietarios en México.

Con base en el libro antes mencionado y datos recabados en la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENSANUT) 2006, Ramírez Silva y colaboradores reportaron en el 2011 un perfil de ingesta lipídica en población mexicana por grupos de edad: escolares (5 – 11 años), adolescentes (12 – 18 años), adultos (19 – 59 años) y adultos mayores (>60 años). En el grupo de los adultos (n=16,366) se estimó que el 66.3% de la población tenía una ingesta adecuada de grasa total (15 a 30% ITE), 23% inadecuada por exceso y 10.7% inadecuado por deficiencia. En el caso de la GS, el 57% de la población la consume de manera adecuada y 42.8% inadecuada por exceso. De manera interesante, este estudio también reveló que el 58.3% de los mexicanos comen menos GPI de la recomendada (<6%) y sólo el 39.1% de manera adecuada. Prácticamente la totalidad de la población tiene una ingesta adecuada de GT (96.4% < 1% ITE) pero una proporción altísima ingiere menos ácidos grasos de la

familia Omega-6 y Omega-3 de lo recomendado (94.7% y 99.9%) respectivamente. La media nacional de ingesta en la relación Omega-6/Omega-3 fue de 16:1 y el 84.6% de la población estudiada no consume un balance adecuado de esta relación (5:1 a 10:1) [17].

2.6 Determinación de la ingesta lipídica.

La cuantificación de la ingesta lipídica y otros nutrimentos puede realizarse por métodos documentales basados en el registro puntual de los alimentos que se consumen de manera cotidiana. Existen diversos métodos publicados en la literatura científica para evaluar esta ingesta; los más precisos para realizar análisis de la dieta en el corto plazo son el diario de registro de alimentos (DRA) y el recordatorio de 24 horas (R24) [19]. En el caso del DRA se le entrega al paciente un formato impreso en donde asienta de forma detallada los alimentos que consume a lo largo del día (preferentemente 2 días entre semana y 1 día del fin de semana). En algunos estudios se provee al paciente de una báscula que le permite registrar con precisión el peso de los alimentos que consume; no obstante, en algunas ocasiones el procedimiento del pesaje es difícil de realizar. En otros estudios el paciente está confinado a un centro de investigación u hospital en donde recibe sus alimentos de una forma estandarizada. Cuando se desea hacer el análisis de la ingesta en condiciones habituales o en vida libre, una alternativa para estimar de manera más precisa el tamaño de las porciones y el modo en que se prepararon los alimentos que se consumen, consiste en tomar fotografías junto a escalas o modelos que ayudan a complementar la información registrada de manera escrita en el formato impreso.

El recordatorio de 24 horas (R24) se realiza en un formato tipo entrevista, en donde un nutricionista recopila la información de manera personal o vía telefónica del paciente, haciendo énfasis en el tipo, tamaño de la porción, modo de preparación y hora de ingesta de todos los alimentos consumidos durante las últimas 24 horas.

Otro método muy utilizado en estudios con poblaciones grandes y en los que se desean identificar patrones dietarios es el cuestionario de frecuencia de alimentos (CFA). De una lista de alimentos variados se le solicita al paciente que indique cuál de ellos consume con mayor regularidad. Este método es el más adecuado para estimar la ingesta en el mediano y largo plazo (meses y años, respectivamente). Los sesgos de memoria del entrevistado y la no inclusión de alimentos que se consumen de manera particular en ciertas regiones son las principales desventajas del CFA [19]. En el cuadro 3 se muestran las principales características y atributos de los métodos documentales más utilizados para realizar análisis de la dieta.

Una vez que se ha recopilado la información de la dieta, ésta puede ser procesada mediante programas especializados en donde es posible calcular la ingesta de los diferentes tipos de nutrimentos por día. Una gran ventaja de estos programas computarizados es que la información puede ser actualizada y complementarse con información de alimentos que sólo se consumen en ciertas localidades o que tienen alguna particularidad en su elaboración.

Cuadro 3. Comparación de diversas características de los principales instrumentos de evaluación dietaria. Tabla adaptada y modificada de Thompson F y Subar A [19].

	Diario Ingesta	R 24 h	CFA	Historia Dietaria	Tamizaje
<i>Tipo de información que puede recaudarse</i>					
Información detallada de los alimentos consumidos.	✓	✓		✓	
Información general acerca del grupo de alimentos consumidos.			✓		✓
Detalles específicos de la comida.	✓		✓	✓	
<i>Alcance de la información recaudada</i>					
Dieta total.	✓	✓	✓	✓	
Componentes específicos.					✓
<i>Periodo de tiempo evaluado</i>					
Corto plazo (días).	✓	✓		✓	
Mediano y largo plazo (meses, años).			✓		✓
<i>Requerimientos cognitivos</i>					
Medición o registro estimado de alimentos y bebidas a medida que se consumen.	✓				
Memoria de consumo reciente.		✓		✓	
Capacidad de hacer juicios sobre la dieta a largo plazo.			✓	✓	✓
<i>Adecuado para comparaciones interculturales sin adaptación del instrumento</i>					
SI	✓	✓		✓	
NO			✓		✓

Abreviaturas: R 24 h= recordatorio de 24 horas; CFA= cuestionario de frecuencia de alimentos.

2.7 Biomarcadores de la ingesta lipídica.

La mayoría de los métodos documentales para evaluar la ingesta de lípidos han sido validados contra diversos indicadores bioquímicos. Probablemente el indicador más utilizado para evaluar su ingesta es el perfil de ácidos grasos presente en la membrana eritrocitaria y en los fosfolípidos del suero sanguíneo. Numerosos estudios han demostrado que la composición de ácidos grasos en los tejidos biológicos se modifica cuando la ingesta de lípidos varía [20-22]. De esta manera, se sabe que el perfil lipídico en el plasma sanguíneo refleja preferentemente el consumo de grasa en el corto plazo [22] mientras que el perfil de lípidos en las membranas de los eritrocitos se considera un mejor marcador de la ingesta en el mediano plazo. Asimismo, el perfil eritrocitario se ha utilizado extensamente en estudios de suplementación, particularmente con los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), para determinar el apego al tratamiento en intervenciones terapéuticas con estos ácidos grasos.

No obstante que los lípidos de la dieta se relacionan con los perfiles en suero y en eritrocitos, los niveles de correlación observados entre los métodos documentales y los marcadores bioquímicos, son débiles o en el mejor de los casos, moderados, con coeficientes (r) que se sitúan entre valores de 0.2 a 0.5. Dado que el metabolismo lipídico es dinámico y complejo, resulta difícil encontrar mejores niveles de asociación entre estos métodos. El *pool* de ácidos grasos en suero, además de estar relacionado con la ingesta reciente de alimentos, es un reflejo del metabolismo hepático y la movilización del tejido adiposo corporal (principal reservorio de AG). Aunado a ello, el organismo es capaz de

sintetizar de *novo*, prácticamente todos los AG que están presentes en el organismo; sólo los ácidos grasos trans y los ácidos linoleico (AL) y linolénico (ALN) son esenciales.

Los ácidos grasos saturados de cadena corta y media, están presentes de manera abundante en la dieta, pero también pueden ser biosintetizados a partir de acetil coenzima A, intermediario del metabolismo de los hidratos de carbono: dietas altas en azúcares simples se han asociado con niveles elevados de lípidos séricos. Por otra parte, los ácidos EPA y DHA y araquidónico (ARA), son producto de la elongación y la desaturación del ALN y AL, respectivamente. Éstos últimos compiten por las mismas enzimas que los elongan (ELOVL, por su nombre en inglés: *elongation of very long chain fatty acids*) y los desaturan (FADS, por su nombre en inglés: *fatty acid desaturase*); es debido a esta competencia de índole cuantitativa que se ha sugerido una relación ideal de ingesta 10:1 de AL con respecto al ALN. Los productos finales de estas reacciones de elongación y desaturación: EPA, DHA y ARA, cumplen funciones tan relevantes en el organismo, que el estudio del metabolismo de estos AG se ha profundizado de manera importante durante los últimos años. Un artículo publicado recientemente por Yao Zhan y colaboradores, reseña algunas variantes polimórficas de los genes que codifican para estas enzimas y que pueden afectar la biosíntesis de EPA, DHA y ARA [23].

La suplementación de AG omega-3 en dosis farmacológicas (>2 g por día) enriquece de manera significativa las concentraciones de EPA y DHA en las membranas eritrocitarias desde el primer mes de la suplementación. Dado que el tiempo de vida media de los eritrocitos es de 120 días, la incorporación de los ácidos grasos en la membrana de esta célula es comúnmente utilizado como un marcador de apego al tratamiento en el mediano

plazo [24 - 26] Se ha observado que desde el primer mes posterior a la suplementación hay un incremento significativo en las concentraciones de estos AG en la membrana. Es imprescindible tener en cuenta que la composición de las membranas celulares está supeditada a la función que podría tener cada célula en el organismo.

Algunos autores han sugerido que el perfil de ácidos grasos en eritrocitos constituye un buen reflejo de la composición lipídica en el músculo esquelético. No obstante, recientemente se reportaron diferencias importantes en diversos ácidos grasos de la familia omega-3, omega-6 y omega-9 al comparar la membrana eritrocitaria y el tejido muscular [27]. Por esta razón no es posible asumir que ambos perfiles son comparables en cuanto a su composición lipídica y a veces resulta necesario realizar el análisis directamente en el tejido muscular si se desea estudiar algún efecto metabólico a este nivel.

Como un resultado secundario y preliminar derivado de la presente investigación, en la cuadro 4 se muestra el perfil de familias lipídicas determinadas en músculo, eritrocitos y suero de 28 sujetos metabólicamente sanos; estos datos se calcularon a partir del perfil de AG determinado por cromatografía de gases. De manera interesante, la composición lipídica de los tejidos es distinta en casi todas las familias estudiadas. Sólo la grasa saturada y monoinsaturada, no fueron diferentes al comparar eritrocitos vs suero y músculo vs eritrocitos, respectivamente. De manera particular es interesante la relación Omega 6/Omega 3 observada en los eritrocitos: es de casi la mitad con respecto a la relación observada en músculo y de casi 2/3 de lo reportado en suero.

Cuadro 4. Comparación del perfil de familias lipídicas en músculo, eritrocitos y suero de sujetos adultos metabólicamente sanos (n=28).

Tipo de grasa	Músculo (%)	Eritrocito (%)	Suero (%)	Significancia
Saturada	49.5 (37.1 – 54.9)	28.8 (17.9 – 45.8)	29.1 (27.3 - 29.9)	a, b
Monoinsaturada	32.4 (25.0 – 42.0)	37.7 (16.2 – 50.3)	24.9 (23.4 – 28.0)	b, c
Poliinsaturada	18.6 (15.9 – 19.7)	30.7 (27.4 – 36.7)	44.8 (42.7 – 48.2)	a, b, c
Trans	1.19 (0.87 – 1.35)	1.67 (1.18 – 2.04)	0.72 (0.52 – 0.91)	a, b, c
Poliinsaturada $\Omega 6$	17.2 (14.6 – 17.6)	25.7 (23.0 – 31.2)	42.1 (40.2 – 44.8)	a, b, c
Poliinsaturada $\Omega 3$	1.35 (1.22 – 1.61)	4.31 (4.11 – 5.06)	2.56 (2.37 – 2.89)	a, b, c
Relación $\Omega 6/ \Omega 3$	12.1 (9.8 – 12.1)	5.97 (5.59 – 6.17)	16.4 (15.5 – 16.7)	a, b, c

Datos presentados como mediana (percentiles 25 -75); a = diferencia significativa entre músculo y eritrocitos; b = diferencia significativa entre músculo y suero; c = diferencia significativa entre eritrocitos y suero.

2.8 Ceramidas y lípidos de la dieta.

Hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo relacionado explícitamente con el efecto de la ingesta de lípidos sobre el perfil de ceramidas y otras familias lipídicas en seres humanos. Kien et al suministró a 9 mujeres y 9 hombres entre 18 y 40 años de edad con IMC entre 18 y 30 kg/m² una dieta alta en palmitato (DAP, C16:0= 16% Kcal del GET) y una dieta alta oleato y baja en palmitato (DAO, C18:1=28.8% Kcal; C16:0=2.4% Kcal del GET) [28]. En el caso particular de las ceramidas, se observó un incremento significativo en el tejido muscular de los sujetos que recibieron la DAP. Este hallazgo fue similar al observado en un modelo experimental con ratas alimentadas con una dieta elevada en grasa saturada, grasa monoinsaturada y grasa poliinsaturada. De manera interesante se observó que los diferentes tipos de lípidos suministrados en la dieta, modulan de manera distinta la actividad de las enzimas que son clave en la biosíntesis de esfingolípidos y de ceramidas. Asimismo, se observó que una dieta alta en grasa saturada generó un incremento en el contenido total de ceramidas musculares.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La evidencia del efecto que el tipo de lípidos ingeridos en la dieta podría tener sobre el perfil de ceramidas en el ser humano es casi inexistente; no obstante que la información teórica disponible sobre las reacciones químicas que participan en la biosíntesis de las ceramidas, sugiere que algunos ácidos grasos desempeñan un rol fundamental en ésta. La evidencia aislada de una posible asociación entre los diferentes lípidos de la dieta y las ceramidas, no resultaría trascendente en sí misma si no estuviera situada en el contexto de alguno de los procesos salud-enfermedad.

Está bien documentado el efecto adverso de las ceramidas sobre diversas alteraciones metabólicas. Algunos autores han demostrado que el incremento de estas moléculas, particularmente en tejido muscular, disminuye la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos no se han controlado algunos de los factores clave relacionados con este trastorno metabólico (adiposidad corporal, dislipidemias, inflamación y envejecimiento).

Consideramos que sería trascendente contribuir al proceso explicativo y poco explorado que relaciona la ingesta lipídica y el perfil de ceramidas en seres humanos en el contexto de sus hábitos dietarios convencionales y libres. Asimismo, explorar la relación entre las ceramidas presentes en tejido circulante y muscular y la sensibilidad a la insulina en un diseño experimental más controlado en términos de la multiplicidad de variables confusoras relacionadas con la sensibilidad a la insulina.

4. JUSTIFICACIÓN.

Se estima que la prevalencia de resistencia a la insulina en la población mexicana aparentemente sana puede ser hasta del 36% [29]. Diversos estudios han demostrado que este trastorno metabólico es un factor de riesgo para el desarrollo de Diabetes Mellitus Tipo 2 y Enfermedad Cardiovascular (OR=3.12, 95% IC=1.36-7.14 y OR=2.52, 95% IC= 1.46-4.36, respectivamente) [30]. Asimismo, está documentado que una proporción importante de la población mexicana tiene una ingesta inadecuada de lípidos (42.8% ingesta excesiva de GS y 58.3% ingesta inadecuada de GPI) [17].

Recientemente se ha observado que las ceramidas tienen un efecto adverso sobre la sensibilidad a la insulina, particularmente en tejido muscular. No obstante, se desconoce el efecto que podría tener la dieta sobre la síntesis de determinado perfil de ceramidas y la magnitud de asociación de éste con la sensibilidad a la insulina.

Si la dieta desempeña una función trascendente en el subtipo de ceramidas presentes en el organismo, adecuaciones en la ingesta de lípidos podría tener un efecto favorable sobre la sensibilidad a la insulina y la prevención de trastornos metabólicos más graves.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General

Determinar la asociación entre el tipo de lípidos ingeridos en la dieta y el perfil de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular y su relación con la sensibilidad a la insulina en adultos eutróficos aparentemente sanos.

5.2 Objetivos Específicos

- Realizar el montaje y la estandarización de un método para la determinación de ceramidas plasmáticas y musculares por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).
- Describir y cuantificar la ingesta de macronutrientes (hidratos de carbono, azúcares simples, y proteínas) así como el tipo de lípidos ingeridos en la dieta mediante un diario de registro de alimentos de tres días.
- Correlacionar las concentraciones de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular versus los macronutrientes y tipo de lípidos ingeridos en la dieta.
- Determinar la relación entre el subtipo de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular y la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE.
- Correlacionar las concentraciones de ceramidas plasmáticas con otras variables bioquímicas relacionadas con el metabolismo lipídico.

6. HIPÓTESIS

El tipo de lípidos ingeridos en la dieta correlacionará con el subtipo de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular, que a su vez mostrarán una relación inversa ($r \approx -0.45$) con el grado de sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp hiperinsulinémico-euglicémico en adultos eutróficos aparentemente sanos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 Diseño de estudio.

Transversal analítico.

7.2 Población de estudio.

Los participantes de este estudio fueron seleccionados y reclutados de una base datos de estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (n≈200). Asimismo, se invitó a familiares directos de estos participantes que pudieran estar interesados en el estudio y que cumplieran con los requisitos de inclusión.

7.2.1 Criterios de Inclusión: mujeres y hombres entre 21 y 50 años de edad con un IMC mayor a 18.5 y menor 25 kg/m² aparentemente sanos, que residieran en la zona metropolitana de la Ciudad de México.

7.2.2 Criterios de Exclusión: fueron excluidos aquellos sujetos que cursaran con intolerancia a la glucosa en ayuno, síndrome metabólico o diabetes, así como el consumo de fármacos hipolipemiantes (ej. estatinas o fibratos) o fármacos hipoglucemiantes (ej. sulfonilureas o biguanidas). Asimismo, que hayan ingerido con al menos 1 mes anticipación al desarrollo de este estudio algún suplemento de ácidos grasos.

7.2.3 Criterios de eliminación: aquellos sujetos que no asistieran a la segunda fase del estudio o que no completaran de manera adecuada y correcta el diario de registro de alimentos de 3 días.

7.3 Tamaño de muestra.

Se utilizó una fórmula para correlaciones con un nivel de confianza del 95% y un poder estadístico del 80%. Los valores para la estimación de la muestra se obtuvieron de acuerdo al trabajo publicado por Amati [12] que reportó una correlación de 0.45 entre un factor que agrupa diversas sub-especies de ceramidas y la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE.

$$n = \left(\frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3$$

Sustituyendo:

$$n = \left(\frac{1.96 + 0.84}{0.5 \ln \left(\frac{1+0.45}{1-0.45} \right)} \right)^2 + 3 = 37.02$$

7.4 Protocolo de estudio.

El estudio se realizó en dos citas o fases consecutivas con un intervalo de separación de dos a tres semanas. En la primera cita se les explicó a los pacientes el objetivo del estudio y se solicitó su participación mediante una carta de consentimiento informado. Posteriormente se realizó una valoración clínica integral del estado de salud y nutrición del paciente. Se obtuvo una muestra por punción venosa en ayuno para determinar los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y HDL-colesterol. Los pacientes que fueron identificados con intolerancia a la glucosa en ayuno (glucosa >100 mg/dl), diabetes (glucosa ≥126 mg/dl),

síndrome metabólico (de acuerdo con los criterios del panel para adultos de la *National Cholesterol Education Program*: obesidad abdominal >102 en hombres y >88 en mujeres; glucosa > 100 mg/dl; triglicéridos >150 mg/dl; HDL-colesterol <50 mg/dl en mujeres y <40 mg/dl en hombres; y/o presión arterial \geq 130-85 mmHg) u otra enfermedad crónica fueron excluidos de la segunda fase del estudio y se les brindó asesoría nutricional. Al final de la primera cita se le entregó a cada participante un formato impreso de diario para el registro de alimentos de 3 días (2 días entre semana y 1 día del fin de semana) y se les explicó detalladamente la manera correcta para registrar el tipo, la marca y la cantidad de alimentos ingeridos durante este periodo.

Cita 2: los pacientes fueron citados a las 7:00 am en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con 8 a 10 horas de ayuno. Se solicitó la entrega del diario de registro de alimentos y se determinó el peso y la composición corporal del paciente por bio-impedancia eléctrica con un equipo *Inbody 230* de *Biospace Co.*, Corea. Posteriormente se procedió a la extracción de una biopsia de tejido muscular por punción percutánea del vasto lateral del cuádriceps derecho guiada por ultrasonido. Para aminorar el dolor durante el desarrollo de este procedimiento se aplicó anestesia local con lidocaína inyectable al 2% con una aguja de insulina, posteriormente a la desinfección tópica del área a puncionar. Se obtuvo con una aguja nueva, estéril y desechable una muestra de tejido por triplicado que fue congelada inmediatamente y almacenada en un vial estéril a -70°C. Se colocó un apósito hidrocólicoide en la zona de punción para mantener la herida aislada y facilitar su cicatrización.

Finalmente se realizó un Clamp Hiperinsulinémico-Euglucémico de acuerdo al método descrito por DeFronzo en 1979 [7]. Para administrar la infusión de glucosa e insulina se colocó un catéter intravenoso ante cubital en uno de los brazos. En el brazo distal se colocó otro catéter intravenoso en posición retrógrada a la altura del dorso de la mano contralateral y se mantuvo en un cojín de calentamiento eléctrico con el objetivo de arterializar la sangre venosa. El catéter distal se utilizó para la toma de muestras sanguíneas (0.5 ml) para la determinación de las concentraciones de glucosa plasmática cada 5 minutos durante 180 minutos, que es el tiempo estimado para la realización del Clamp HE. El volumen total de sangre requerido para las determinaciones de glucosa en los tiempos señalados es de aproximadamente 20 ml. La infusión de insulina de acción rápida (Humulin R, Laboratorios Lilly) se calculó de acuerdo con la superficie corporal de cada paciente (SC) y se administró un bolo inicial ($100 \text{ mU insulina/m}^2 \cdot \text{SC} \cdot \text{min}$) durante 10 minutos; posteriormente la infusión de insulina se mantuvo a una tasa constante de $80 \text{ mU insulina/m}^2 \cdot \text{SC} \cdot \text{min}$ (hiperinsulinemia). El flujo de la solución de glucosa al 20% se ajustó paulatinamente con la finalidad de mantener niveles de glucosa de $90 \pm 5 \text{ mg/dl}$ (euglicemia). Entre los 150 y 180 minutos se espera alcanzar un periodo de estabilidad de 30 minutos (*steady state*) en donde ya no se observan variaciones en las concentraciones de glucosa plasmática a un flujo determinado de la solución de glucosa. El valor M del Clamp HE corresponde a este flujo expresado en $\text{mg de glucosa /Kg} \cdot \text{min}$ que la persona requiere para mantener un valor de euglicemia constante (90 mg/dl) en un estado de hiperinsulinemia (80 mU insulina). Una vez concluido el Clamp, el paciente se retiró hasta que sus niveles postprandiales de glucosa permanecieron estables y en rango de

normalidad. Se le entregó a cada paciente una tira con 3 comprimidos de Ketorolaco de 10 mg cada uno, con indicaciones de ingerir 1 comprimido cada 8 horas si se presentaba dolor en la zona de punción de la biopsia.

7.5 Determinación de la ingesta lipídica.

La información detallada sobre la hora y ocasión de ingesta, el tipo, tamaño de la porción, forma de preparación y/o marca de los alimentos que cada paciente recopiló en el diario de registro de alimentos de tres días fue capturada y procesada en el software “*The Food Processor*” ESHA Research Versión 10.11.0 (actualizado con los datos publicados por Villalpando et al [16]). Del análisis de la dieta se obtuvo el promedio correspondiente de la ingesta total de energía (kcal/día), los macronutrientes (g/día) y las familias lipídicas (g/días). El nivel de adecuación de la ingesta total de energía se realizó con respecto al gasto energético total (GET) que se calculó con base en las ecuaciones actualizadas de la FAO/OMS/ONU considerando la edad, el sexo, el peso y la actividad física de cada participante [31]. El porcentaje de adecuación de los macronutrientes se estimó de acuerdo con las recomendaciones de la OMS con respecto a la ingesta total de energía (ITE): hidratos de carbono 55%, lípidos 30%, proteínas 15% y azúcares simples <10%. Para los niveles de adecuación de las familias lipídicas se utilizaron los criterios utilizados previamente por Ramírez-Silva *et al*: grasa saturada y monoinsaturada <10%, grasa poliinsaturada entre el 6% y 10% (5 a 8% de Omega-6 y 1 a 2% de Omega-3) y grasa trans <1%; en todos los casos con respecto a la ITE [17].

Finalmente se calculó la proporción de sujetos de acuerdo con el porcentaje de adecuación de los requerimientos ideales de energía, macronutrientes y tipo de lípidos: <90% inadecuado por deficiencia, 90-110% adecuado, >110% inadecuado por exceso.

7.6 Determinaciones bioquímicas.

7.6.1 Purificación y extracción de ceramidas plasmáticas.

Se realizó una adaptación y modificación del método descrito originalmente por Kasumov et al [32], utilizado por nuestro grupo de investigación en un trabajo previo publicado recientemente [33]. Todos los disolventes utilizados en esta técnica fueron grado cromatográfico. Para el análisis de ceramidas de baja concentración (C14:0, C18:1 y C18:0) se utilizaron 200 µl de plasma y para las ceramidas de concentración más elevada (C16:0, C20:0, C24:1 y C24:0) se utilizaron 40 µl de muestra. En un tubo de plástico de 7 ml se agregó la alícuota de plasma correspondiente y 1.4 ml de metanol. Las proteínas precipitadas fueron separadas con una centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó en un tubo nuevo y se agregaron 1.2 ml de cloroformo. La mezcla se agitó en vórtex durante un minuto y posteriormente se añadió 1 ml de agua; se agitó en vórtex nuevamente durante un minuto más. La muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se observó la formación de dos fases. La fase acuosa (capa superior) se descartó y la fase orgánica (parte inferior) se evaporó con nitrógeno de ultra alta pureza (NUAP) a 40 ° C. El extracto seco se reconstituyó con 500 µl de diclorometano y se pasó a través de una columna de extracción de fase sólida *Strata SI-1 Silica* (55 µm, 70 Å, 200 mg / 3 ml; Phenomenex, California, EUA) previamente lavada con 500 µl de diclorometano. Las ceramidas se eluyeron con 3 lavados de 500 µl de solución de diclorometano / isopropanol

(70%:30%, v/v). El solvente fue evaporado con NUAP a 40°C. El extracto seco fue reconstituido con 200 µl de etanol y almacenado a -70 ° C. En la figura 4 se muestra un diagrama que resume los procedimientos realizados para la extracción y purificación de las ceramidas plasmáticas.

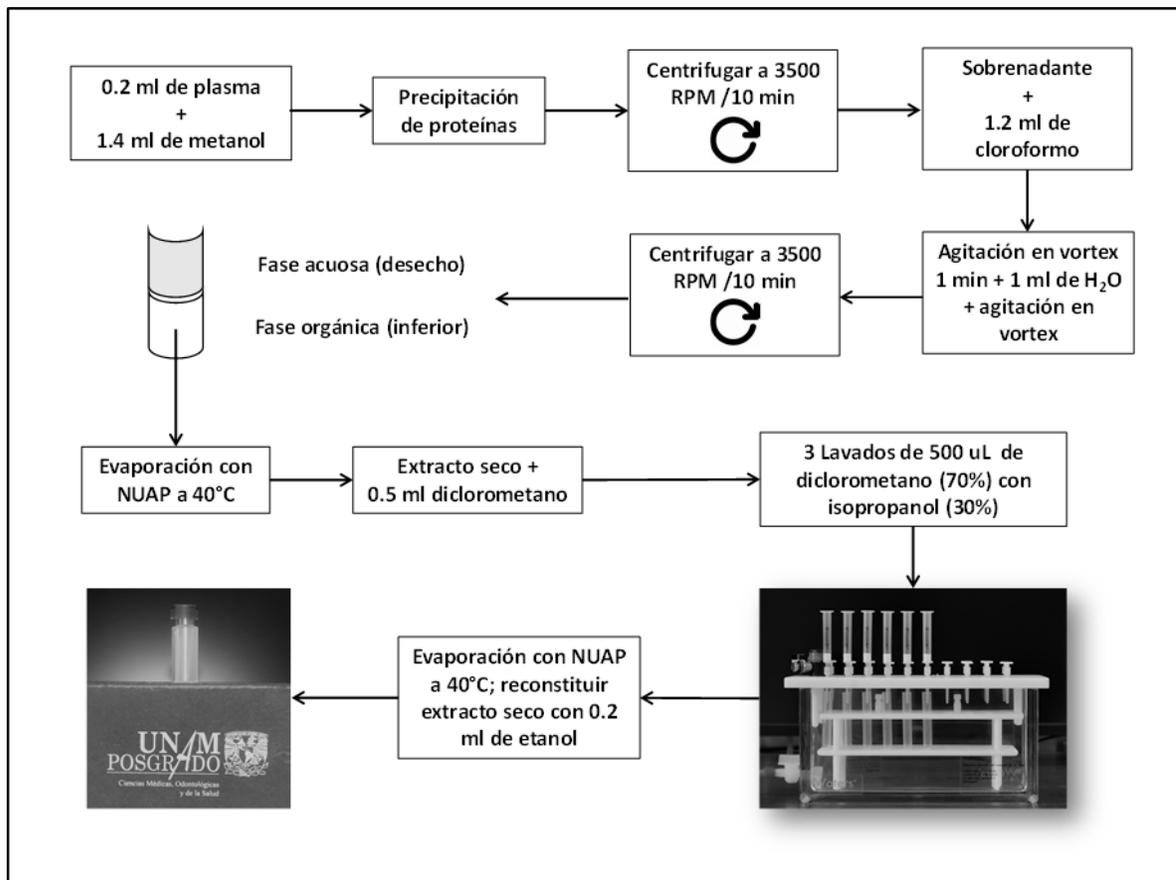


Figura 4. Procedimiento de extracción y purificación de ceramidas plasmáticas.

7.6.2 Purificación y extracción de ceramidas en tejido muscular.

Se tomó una alícuota de tejido muscular (aproximadamente 15 mg) y se colocó en un tubo de plástico nuevo. Mientras el tejido estuvo congelado se maceró con un punzón metálico hasta fragmentarlo y se agregaron 1.4 ml de metanol. Se tapó el tubo con un tapón de vidrio

esmerilado y se agitó vigorosamente en Vortex durante 5 minutos; posteriormente se agregaron 1.2 ml de cloroformo y se agitó nuevamente en Vortex 5 minutos más. Los tubos se colocaron en un baño ultrasónico y fueron sonicados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el periodo de sonicación se agregó 1 ml de agua y se agitó por tercera vez en Vortex durante 5 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos y se descartó la fase superior (fase acuosa) observada en el tubo. La fase orgánica fue evaporada con NUAP a 40 °C y se repitió el mismo procedimiento de extracción en fase sólida descrito en el apartado anterior. El extracto seco fue reconstituido con 200 µl de etanol y almacenado a -70 ° C. En la figura 5 se muestra el resumen de los procedimientos realizados para la extracción y purificación de las ceramidas en el tejido muscular.

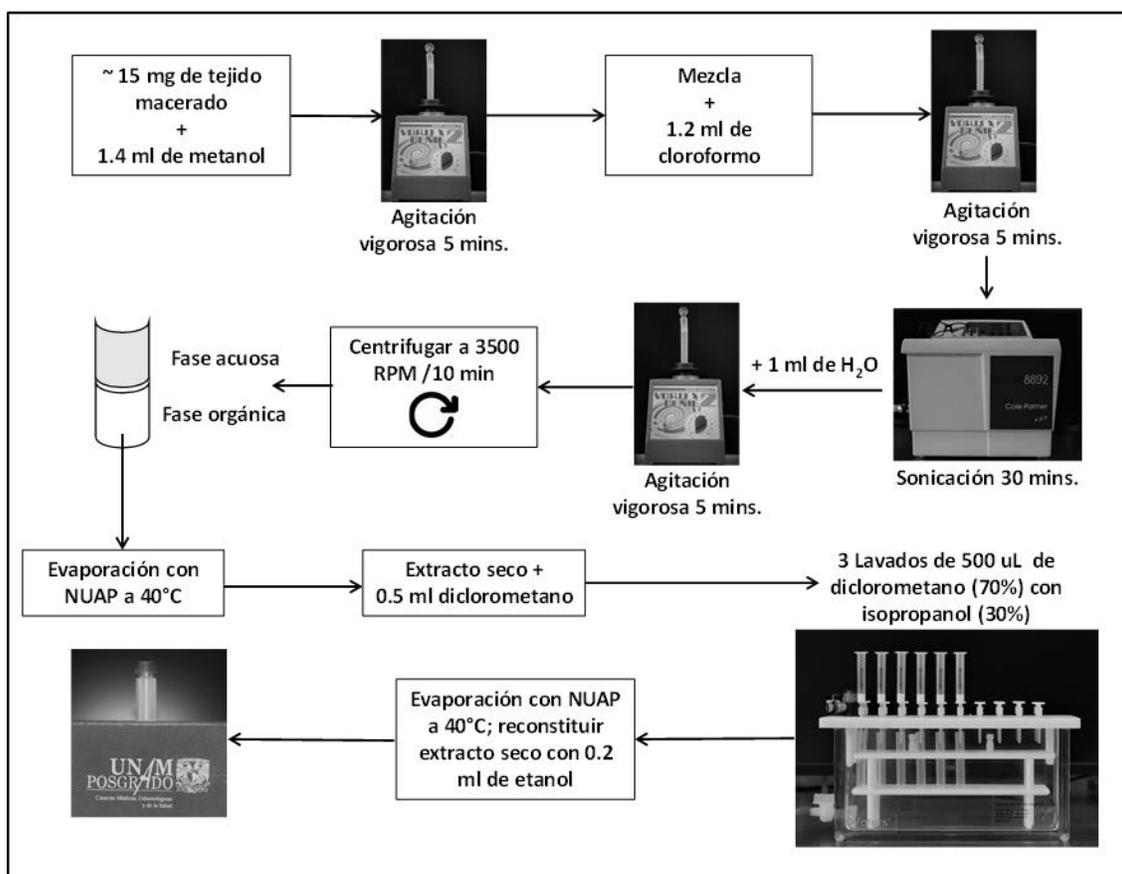


Figura 5. Procedimiento de extracción y purificación de ceramidas plasmáticas.

7.6.3 Análisis cromatográfico de ceramidas.

El perfil de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular se analizaron por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) en un equipo *Waters Xevo TQD Acquity UPLC H-Class* (Waters; Milford, EE. UU.) Se utilizó una columna cromatográfica de 50 x 21 mm modelo Kinetex® 2.6 µm C8 100 Å (Phenomenex; California, EUA). La temperatura de la columna fue de 50 °C y el flujo de la fase móvil de 0,4 ml/min. La fase acuosa (A) se preparó con agua ultra pura y ácido fórmico al 0.2%; la fase orgánica (B) fue una mezcla acetonitrilo/ isopropanol (60%:40%, v/v) al 0.2% de ácido fórmico. El método cromatográfico se inició con un gradiente de 40% de fase móvil A y 60% de fase móvil B que se mantuvo constante durante 0,2 minutos. La proporción de Fase B se incrementó gradualmente hasta llegar a 100% en un tiempo de 13.8 minutos y se mantuvo constante durante 5 minutos para posteriormente regresar a las condiciones iniciales. El tiempo total de ejecución de la corrida fue de 18 minutos.

El acoplamiento entre el sistema cromatográfico de líquidos y el espectro de masas se realizó mediante interfase de ionización de electro spray (ESI, por su nombre en inglés: *Electro Spray Ionization*) a una temperatura de desolvatación de 350°C con Nitrógeno de ultra alta pureza a un flujo 650 l/hr. El voltaje del capilar fue 3.9 kV y el voltaje del cono de 40V.

La detección de las ceramidas se realizó simultáneamente en el modo MRM (por su nombre en inglés: *Multiple Reaction Monitoring*) a una energía de colisión promedio, de 26 volts. En el cuadro 5 se muestran las transiciones de los iones “padre” y los iones “hijo” de las ceramidas analizadas.

Cuadro 5. Iones de transición de las ceramidas estudiadas.

Ceramida	Ion “padre”	Ion “hijo”
Cer C14:0	511	264
Cer C16:0	539	264
Cer C18:1	564.5	264
Cer C18:0	566.5	264
Cer C20:0	594.5	264
Cer C24:1	648	264
Cer C24:0	650.5	264

7.6.4 Otras determinaciones bioquímicas.

Las concentraciones de glucosa, triacilgliceroles, colesterol total y colesterol HDL se realizaron con estuches comerciales en equipo Spin 120 (Spinreact, Girona España). Se obtuvieron coeficientes de variación menores al 7.5% para las determinaciones realizadas.

7.7 Determinación de la actividad física.

En el diario impreso para el registro de alimentos que se le entregó a cada paciente, se anexó un apartado para el reporte de la actividad física. Se les solicitó a los participantes que registraran las horas de actividad física o ejercicio programado realizado durante esa semana. La clasificación de los niveles de actividad física se hizo de acuerdo con los criterios de la OMS [31]. La categoría de “sedentarismo” corresponde con la no-realización de ejercicio o actividad de manera programada. En la categoría de “liviana” se consideran 3

horas semanales, en la “moderada” 6 horas por semana y en la categoría “intensa” de 4 a 5 horas por día.

7.8 Análisis estadístico.

El tipo de distribución de los datos se determinó mediante el estadístico Shapiro-Wilk. Los datos con distribución normal se reportaron como media \pm desviación estándar. Los datos con distribución libre se expresaron como mediana (percentil 25 – 75). Los resultados de la ingesta lipídica se reportaron con estadística descriptiva (proporciones y medidas de tendencia central con sus respectivas medidas de dispersión). La asociación entre los macronutrientes y el tipo de lípidos ingeridos en la dieta y las concentraciones de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular se realizó mediante un análisis de correlación de Pearson o Spearman, según la distribución de los datos. Para determinar la relación entre las concentraciones de diversas ceramidas y la sensibilidad a la insulina se realizó un análisis de regresión lineal múltiple ajustando por covariables. Se corroboró que las variables sometidas al análisis de regresión lineal cumplieran con el supuesto de normalidad. Finalmente se realizó análisis de correlación entre las concentraciones de ceramidas plasmáticas y otras variables bioquímicas. Se consideró un valor de P menor a 0.05 para determinar significancia estadística.

7.9 Aspectos éticos.

Los procedimientos detallados en la presente investigación se apegaron a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud [34] y a la Declaración de Helsinki para la investigación en seres humanos (revisión de Fortaleza, Brasil 2013) [35]. El protocolo de estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de

Investigación Científica del IMSS con número de registro R-2015-785-043. De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, este trabajo es considerado como una investigación con riesgo mayor al mínimo por requerir de la obtención de una biopsia de músculo (vasto lateral) y la realización de un Clamp hiperinsulinémico-euglicémico que requiere la colocación de dos catéteres (uno en cada brazo). El volumen de sangre requerido para el Clamp HE es de aproximadamente 60 ml. En el caso de la biopsia, los resultados publicados hasta el momento no son concluyentes en relación a si los eritrocitos pudieran ser utilizados como un bio-marcador alternativo. Por esta razón resulta necesario analizar el perfil de ceramidas directamente en el tejido muscular si se desean obtener resultados concluyentes y útiles para la población.

Para la realización del estudio se explicó detalladamente el objetivo de éste, y se solicitó por parte del responsable de la Investigación, la autorización por medio de una carta de consentimiento informado. Los datos recabados se trataron con absoluta confidencialidad. Para este efecto las muestras fueron identificadas con un código consecutivo que no hizo ninguna alusión al nombre o identidad del participante; los expedientes y bases de datos fueron resguardadas por el responsable del Proyecto. Los resultados de los análisis individuales generados durante el desarrollo del proyecto serán informados y entregados a cada uno de los pacientes. Se les explicó con claridad los hallazgos y los aspectos relevantes relacionados a la dieta y a su estado nutricional. Se brindó asesoría nutricional a los pacientes que lo requirieron.

8. RESULTADOS.

Se reclutaron 34 sujetos, de los 37 requeridos de acuerdo con el tamaño de muestra calculado preliminarmente (92%). De estos 34 sujetos, 21 fueron mujeres (60%) y 14 hombres (40%). Sólo fue posible extraer biopsia de tejido muscular en 21 sujetos. En el cuadro 6 se muestran las principales características antropométricas y bioquímicas de los participantes. Con una mediana de edad de 28 años, los datos muestran que los sujetos de estudio fueron clínicamente sanos, con parámetros antropométricos y bioquímicos dentro de valores normales y compatibles con un adecuado estado de salud metabólica. El valor M derivado del Clamp HE reportó una media de 9.3 mg/kg · min. Todos los participantes tuvieron una sensibilidad a la insulina adecuada de acuerdo con el punto de corte sugerido por Tam *et al* (> 6.5 mg/ kg · min) [36].

Cuadro 6. Características antropométricas y bioquímicas de la población de estudio.

Edad (años)	28	25 -32
Peso (kg)	64.3	± 9.3
IMC (kg/m ²)	23.9	± 1.9
Circunferencia cintura (cm)	80.4	± 6.4
% grasa corporal	28.7	± 6.6
Presión diastólica (mmHg)	70	60 - 80
Presión sistólica (mmHg)	100	97.5 - 110
Valor M Clamp HE (mg/ kg · min)	9.3	± 2.2
Glucosa (mg/dl)	85.8	± 6.3
Triacilgliceroles (mg/dl)	107	± 51.9
VLDL (mg/dl)	22.1	9.6
HDL-C (mg/dl)	43.6	± 10.4
Colesterol (mg/dl)	158.8	± 29.3

Datos presentados como media ± desviación estándar o mediana (percentil 25 – 75).

En la figura 6 se muestra la distribución de sujetos estratificados por nivel de actividad física de acuerdo con los criterios de la OMS. La mayor proporción de sujetos reportó no realizar actividad física (sedentarismo). Un porcentaje importante reportó realizar actividad moderada (6 horas a la semana), seguido de aquellos sujetos con actividad física liviana. Solamente un sujeto de estudio reportó realizar actividad física intensa.

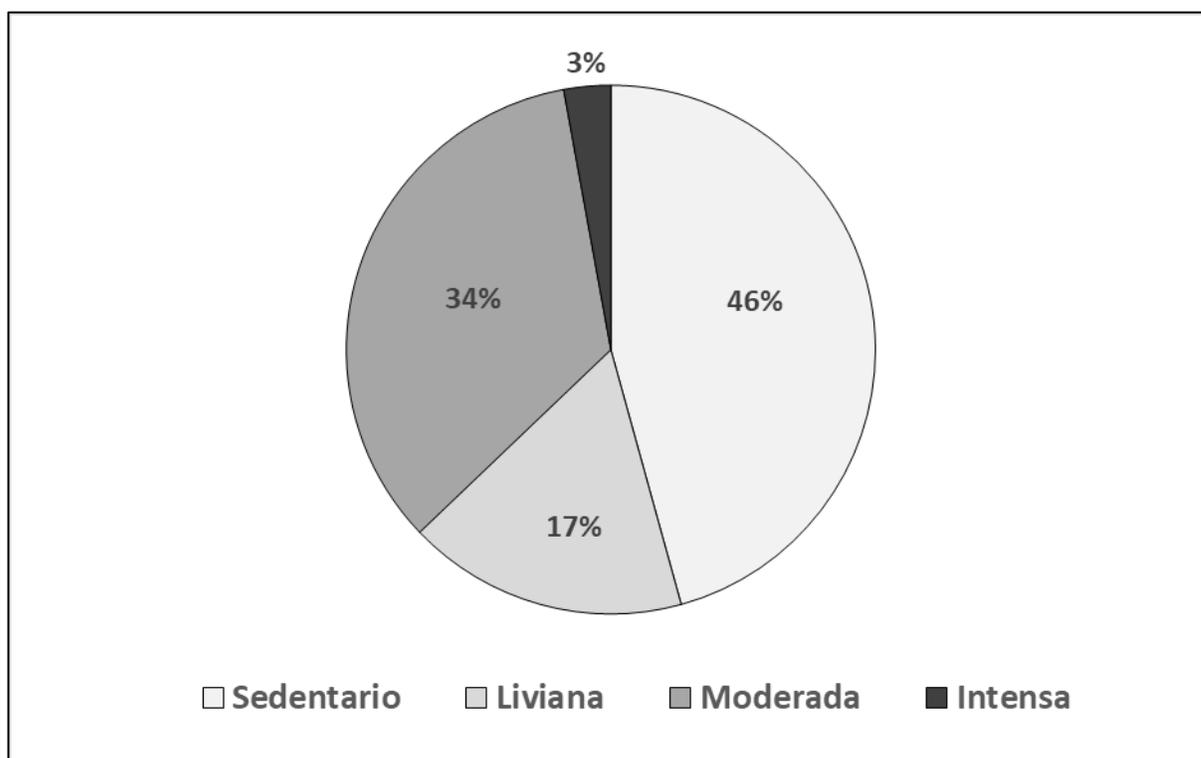


Figura 6. Proporción de sujetos estratificados por nivel de actividad física.

En el cuadro 7 se muestran los resultados de la ingesta de macronutrientos y tipo de lípidos de la población estudiada. Estos valores corresponden al promedio de ingesta de 3 días procesados y calculados a partir de la información asentada por los participantes en el diario de registro de alimentos. Debido a que en la mayoría de las categorías analizadas

los datos reportaron una distribución libre, se muestran estos valores como mediana (percentil 25 – percentil 75).

Cuadro 7. Ingesta de macronutrientes y tipo de lípidos de la dieta de la población estudiada.

Ingesta total de energía (kcal/día)	2427.5	1955.8 - 2894.3
Hidratos de carbono (g/día)	254.5	206.4 - 352.7
Azúcares simples (g/día)	135.1	100.7 - 208.2
Proteínas (g/día)	105.7	77.1 - 127.8
Lípidos (g/día)	76.6	66.8 - 105.2
Grasa saturada (g/día)	24.1	21.1 - 32.4
Grasa monoinsaturada (g/día)	25	18.4 - 33.8
Grasa poliinsaturada (g/día)	12.3	10.1 - 18.4
Grasa trans (g/día)	0.7	0.44 - 1.14
Omega-3 (g/día)	1.33	0.88 - 2.16
Omega-6 (g/día)	13.1	8.9 - 22.3
Relación $\Omega 6 / \Omega 3$	11.04	7.7 - 14.5

Datos presentados como mediana (percentil 25 – 75).

Los resultados de la ingesta de los diferentes nutrimentos expresados en g/día no muestran la variedad en el perfil dietario (en tipo y en cantidad) de los sujetos participantes en el estudio. Para poder realizar esta valoración, en las figuras 7 y 8 se presenta la proporción de sujetos de acuerdo con el nivel de adecuación de ingesta total de energía (ITE), los diferentes macronutrimentos y el tipo de lípidos ingerido en la dieta. La estratificación de la adecuación se realizó de acuerdo con los criterios de la OMS como se detalló previamente en la metodología de este trabajo.

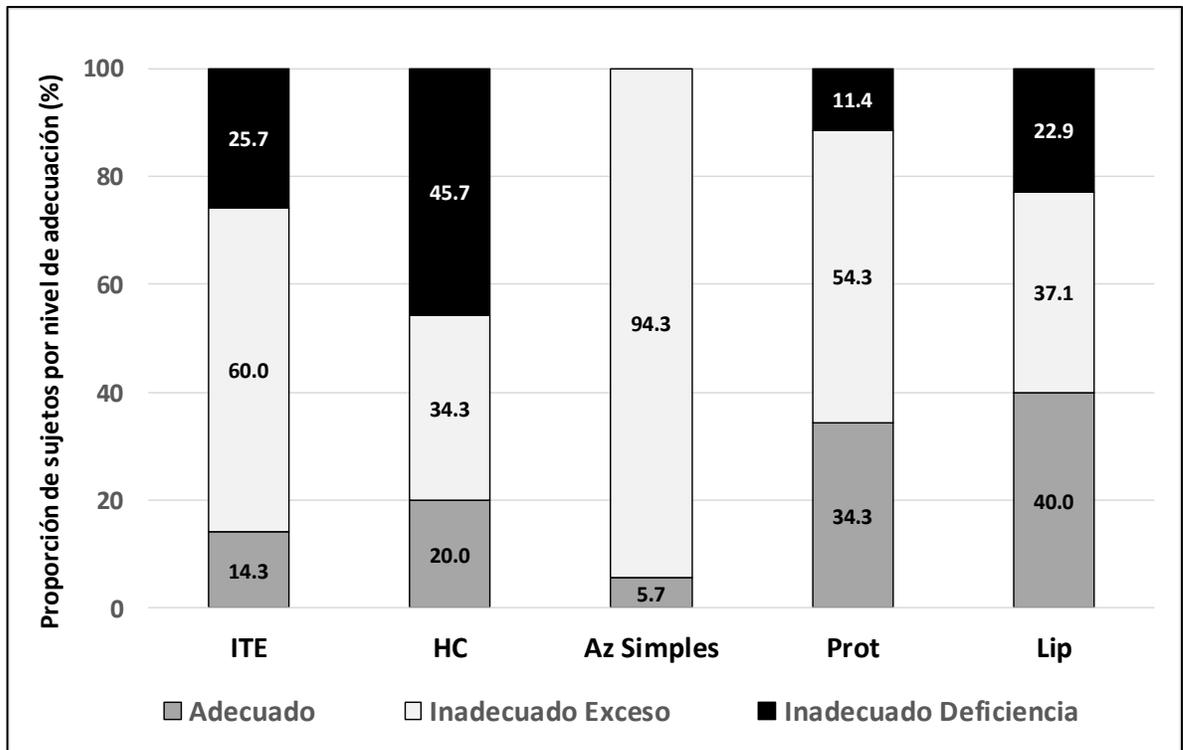


Figura 7. Proporción de sujetos estratificados por nivel de adecuación de ingesta de energía y macro nutrimentos. Abreviaturas: ITE= ingesta total de energía; HC= hidratos de carbono; Az Simples= azúcares simples; Prot= proteína; Lip=lípidos.

De acuerdo con la figura 7, el 60% de los sujetos reportaron una ingesta inadecuada por exceso de energía y sólo el 14.3% una ingesta adecuada. Resulta interesante que, en el caso de los hidratos de carbono, el 45.7% de los participantes ingirió una cantidad menor de lo recomendado (55%). No obstante, resulta indispensable considerar en este balance, que una proporción mayoritaria de sujetos ingirió más energía de lo sugerido. También es notable la proporción de personas (94.3%) que ingieren más azúcares simples de lo recomendado para una dieta adecuada y balanceada. Asimismo, se muestra el perfil de ingesta de proteínas y lípidos totales. De éstos últimos, el 40% de los sujetos los ingirió de

manera adecuada, 37.1% en mayor cantidad a lo recomendado y 22.9% en menor proporción a lo sugerido.

El análisis detallado de la ingesta lipídica observado en nuestro estudio (figura 8) es concordante con la información publicada por Ramírez-Silva [17], el único reporte previo sobre ingesta lipídica en México con representatividad nacional. Nuestro análisis determinó que el 45.7% y el 42.9% de nuestros sujetos, tuvieron una ingesta inadecuada por exceso de grasa saturada y grasa monoinsaturada, respectivamente. Por el contrario, una proporción muy importante de ellos tuvieron una ingesta deficiente de grasa poliinsaturada (71.4%) y ácidos grasos omega-3 (82.9%). De manera notable, la ingesta de grasas trans es adecuada en casi toda nuestra población (94.3%). Finalmente, la relación omega-6/omega-3 fue inadecuada por exceso en más de la mitad de la población (51.4%), no obstante que la mediana de esta relación se situó en valores normales (11.04; cuadro 7). Sólo el 37.1% de nuestros sujetos tuvieron un balance adecuado en la ingesta de estas familias lipídicas. Debe considerarse que una relación más alta en este balance sugiere una ingesta mayor de grasas omega-6 y/o una ingesta menor de omega-3. Sin embargo, el perfil alimentario observado en nuestra población sugeriría sobre todo una ingesta disminuida de ácidos grasos omega-3. El porcentaje de sujetos con ingesta deficiente de omega-3 es de casi el doble con respecto a la ingesta de omega-6 (82.9% vs 42.9). Un aspecto muy relevante si consideramos el efecto protector para múltiples enfermedades que diversos trabajos han atribuido a estos ácidos grasos.

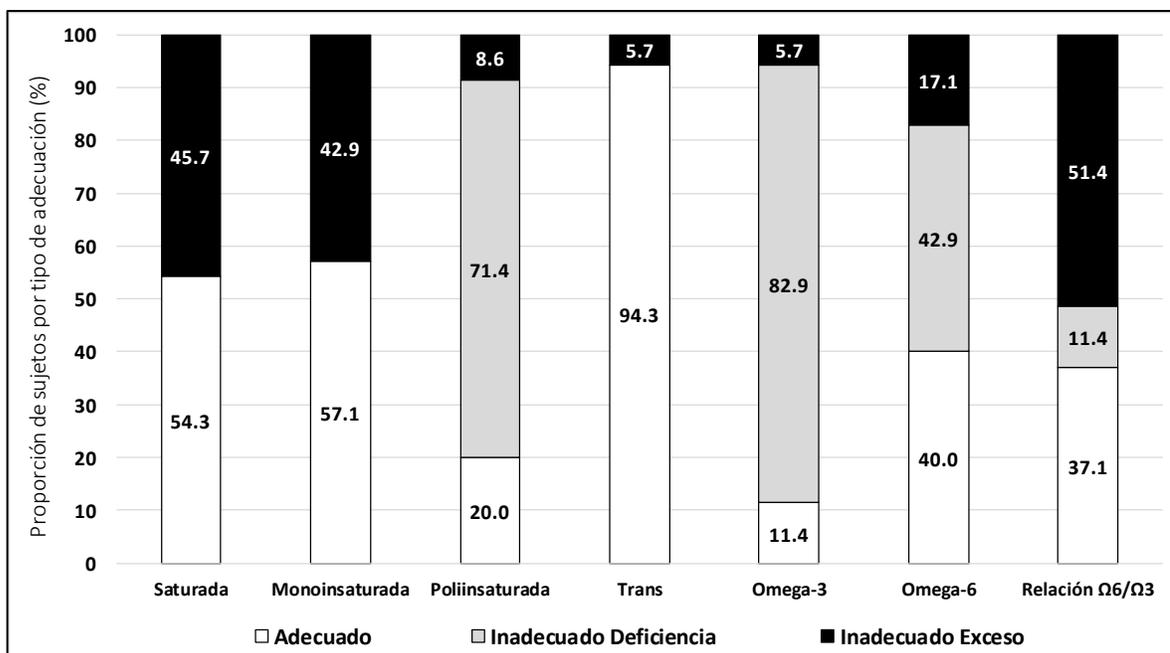


Figura 8. Proporción de sujetos estratificados por nivel de adecuación de ingesta de familias lipídicas.

En la figura 9 se muestra el promedio de las concentraciones plasmáticas (A) y en tejido muscular (B) de las ceramidas estudiadas. En el trabajo previo publicado por nuestro grupo de investigación [32] nos habíamos percatado de la presencia de ceramidas de baja y de alta concentración. Para hacer más demostrativa la descripción de nuestros resultados consideramos conveniente segmentarlas de esta manera. En el caso de las ceramidas en tejido muscular se presentan los promedios de la submuestra en la que fue posible realizar la biopsia de tejido (21 sujetos). Dado que contábamos con el peso del tejido muscular obtenido, nos fue posible reportar los resultados en ng/miligramo de tejido muscular. Las subespecies plasmáticas de baja concentración fueron las ceramidas C14:0, C18:1 y C18:0 con niveles promedio menores a 50 ng/ml. De concentraciones intermedias las ceramidas C16:0 y C20:0 y de alta concentración (>1000 ng/ml) las ceramidas C24:1 y C24:0. En el

tejido muscular las ceramidas baja concentración fueron las ceramidas C14:0, C18:1, C16:0 y C20:0 con valores que oscilaron entre los 0.5 y 9 ng/mg de tejido. Las ceramidas C18:0, C24:1 y C24:0 con valores superiores a 15 ng/mg de tejido.

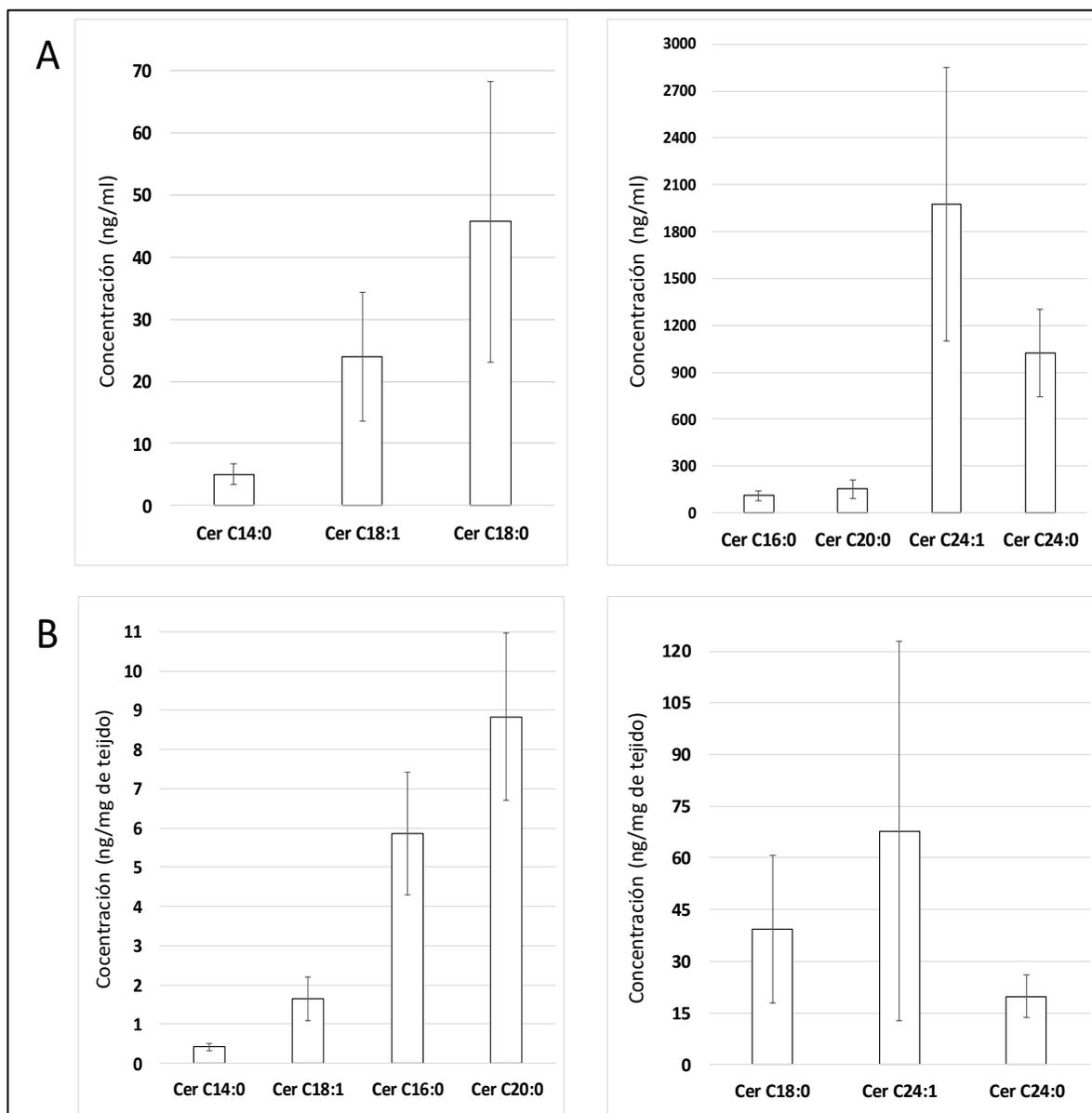


Figura 9. Concentraciones de ceramidas plasmáticas (A) y en tejido muscular (B) de baja y alta concentración. Datos presentados como promedio \pm desviación estándar.

En el cuadro 8 se muestran los resultados del análisis bivariado entre los niveles de ceramidas plasmáticas y los macronutrientes analizados. Se observaron asociaciones significativas o con tendencia estadística entre los hidratos de carbono y las ceramidas C16:0, C18:0 y C20:0. En el caso de los azúcares simples hubo significancia con las últimas dos ceramidas. Asimismo, se obtuvieron correlaciones inversas entre la ingesta de omega-3 y las ceramidas C14:0, C18:1 y C18:0. Con la relación omega-6/omega-3 hubo una asociación directa entre las ceramidas recién mencionadas, además de las ceramidas C16:0 y C20:0. Se observó una correlación inversa entre la ingesta de proteínas y la ceramida C18:1.

Cuadro 8. Correlación entre macronutrientes y tipo de lípidos ingeridos en la dieta versus concentraciones de ceramidas plasmáticas (ng/ml).

	Cer C14:0	Cer C16:0	Cer C18:1	Cer C18:0	Cer C20:0	Cer C24:1	Cer C24:0
HC (g/día)	0.015	0.319[°]	-0.232	0.315[°]	0.355*	0.263	0.213
Az S (g/día)	-0.093	0.252	0.147	0.382*	0.439*	0.300	0.220
Prot (g/día)	0.302	-0.062	-0.465[°]	-0.047	-0.135	0.053	0.209
Lip (g/día)	-0.164	0.054	-0.291	0.069	0.168	0.042	-0.012
GS (g/día)	-0.093	0.109	-0.271	0.098	0.279	0.060	0.005
GMI (g/día)	-0.113	0.098	-0.197	0.112	0.224	0.102	0.014
GPI (g/día)	-0.087	-0.036	-0.353	-0.001	-0.039	-0.131	-0.019
GT (g/día)	0.055	0.102	0.0	0.247	0.196	0.241	0.101
Ω6 (g/día)	-0.035	0.065	0.015	0.113	0.118	0.059	0.067
Ω3 (g/día)	-0.37[°]	-0.244	-0.456[°]	-0.312[°]	-0.281	-0.246	-0.107
Rel. Ω6/Ω3	0.377[°]	0.348[°]	0.441[°]	0.432*	0.380*	0.222	0.144

Análisis de correlación de Spearman (r_s). [°] Tendencia estadística: $< 0.1 P \geq 0.05$; * significancia estadística: $p < 0.05$. Abreviaturas: HC= hidratos de carbono; Az S: azúcares simples; Prot= proteína; Lip= lípidos; GS=grasa saturada; GMI=grasa monoinsaturada; GPI= grasa poliinsaturada; GT= grasa trans; Ω6 =omega-6; Ω3= Omega-3.

En el cuadro 9 se muestra un resumen del análisis de regresión lineal múltiple realizado entre las ceramidas plasmáticas que reportaron una correlación significativa y simultánea con la ingesta de AG omega-3 o la relación omega-6/omega-3 y la ingesta de hidratos de carbono o azúcares simples. Las variables que no mostraron una distribución normal (ceramida C18:0, azúcares simples y relación omega-6/omega-3) fueron transformadas a escala logarítmica. Las tres variables transformadas se distribuyeron normalmente.

Se realizaron tres análisis por separado para las ceramidas C16:0, C18:0 y C20:0 (variable dependiente) y cuatro modelos explicativos con la siguiente combinación de variables independientes: Modelo 1: ingesta de hidratos de carbono y AG omega-3; Modelo 2: ingesta de azúcares simples y AG omega-3; Modelo 3: ingesta de carbohidratos y relación omega-6/omega-3 y Modelo 4: ingesta de azúcares simples y relación omega-6/omega-3.

De manera interesante, los coeficientes de determinación más elevados se observaron en los modelos 4 y 3, de modo consistente con las tres ceramidas analizadas. La relación omega-6/omega-3 mantuvo un efecto significativo sobre los niveles de ceramidas plasmáticas después de ajustar por la ingesta de hidratos de carbono o azúcares simples. En el caso de la ingesta de AG omega-3, ni los coeficientes de determinación ni los coeficientes beta observados (Beta 2), fueron estadísticamente significativos después de ajustar por la ingesta hidratos de carbono o azúcares simples. No obstante, estos últimos (modelo 2), mostraron un efecto significativo sobre las ceramidas analizadas.

Probablemente, la elevada proporción de sujetos con ingesta insuficiente de AG omega-3 (82.9%) haya contribuido a que el efecto mostrado en el análisis bivariado (cuadro

8), no conservara un efecto significativo sobre las concentraciones de ceramidas plasmáticas después de los ajustes que se muestran en el modelo 1.

Cuadro 9. Modelos de regresión lineal múltiple para distintas ceramidas e ingesta de ácidos grasos omega-3 o relación Ω -6/ Ω -3 ajustando por ingesta de hidratos de carbono o azúcares simples.

Variable dependiente= ceramida C16:0				
	<i>Modelo 1</i> (HC y Ω3)	<i>Modelo 2</i> (Log AS y Ω3)	<i>Modelo 3</i> (HC y Log Ω6/Ω3)	<i>Modelo 4</i> (log AS/ Log Ω6/Ω3)
<i>R</i> ²	0.084	0.109	0.186	0.214
Sig.	0.281	0.188	0.055	0.031
Beta 1	0.094	47.13[^]	0.084	42.2*
Beta 2	-2.52	-2.7	49.45*	51.3*
Variable dependiente= logaritmo ceramida C18:0				
	<i>Modelo 1</i> (HC y Ω3)	<i>Modelo 2</i> (Log AS y Ω3)	<i>Modelo 3</i> (HC y Log Ω6/Ω3)	<i>Modelo 4</i> (log AS/ Log Ω6/Ω3)
<i>R</i> ²	0.084	0.205	0.224	0.345
Sig.	0.294	0.040	0.029	0.003
Beta 1	0.001	0.413*	0	0.393*
Beta 2	-0.023	-0.025	0.386*	0.394*
Variable dependiente= ceramida C20:0				
	<i>Modelo 1</i> (HC y Ω3)	<i>Modelo 2</i> (Log AS y Ω3)	<i>Modelo 3</i> (HC y Log Ω6/Ω3)	<i>Modelo 4</i> (log AS/ Log Ω6/Ω3)
<i>R</i> ²	0.117	0.23	0.241	0.358
Sig.	0.155	0.016	0.016	0.001
Beta 1	0.2[^]	125.4*	0.18[^]	102.9*
Beta 2	-6.4	-6.88	100.4*	121.4*

Abreviaturas: HC=hidratos de carbono, Ω 3= omega-3, AS= azúcares simples, Ω 6/ Ω 3= relación omega-6/omega-3, log= logaritmo base 10. En todos los modelos Beta 1= hidratos de carbono o azúcares simples. En todos los modelos Beta 2= omega-3 o relación omega-6/omega-3. * P<0.05, [^] Tendencia estadística: < 0.1 P ≥ 0.05.

En el cuadro 9 se muestran los resultados entre los macronutrientes analizados y las concentraciones de las ceramidas en tejido muscular. La ceramida C18:0 mostró correlaciones inversas con la ingesta de lípidos totales y las grasas saturada, monoinsaturada y poliinsaturada. Asimismo, se observaron correlaciones inversas entre la ingesta de proteínas y las ceramidas C18:1, C20:0 y C24:1. Los hidratos de carbono, correlacionaron también inversamente con la ceramida C14:0 y la C18:0. Finalmente, la ceramida C24:1 correlacionó inversamente con la grasa monoinsaturada.

Cuadro 10. Correlación entre macronutrientes y tipo de lípidos ingeridos en la dieta versus concentraciones de ceramidas en tejido muscular (ng/ mg de tejido).

	Cer C14:0	Cer C16:0	Cer C18:1	Cer C18:0	Cer C20:0	Cer C24:1	Cer C24:0
HC (g/día)	-0.379[^]	-0.105	-0.276	-0.369[^]	-0.071	-0.247	-0.197
Az To (g/día)	-0.170	0.096	-0.081	-0.286	-0.057	-0.286	-0.233
Prot (g/día)	-0.214	-0.248	-0.484*	-0.051	-0.438*	-0.380[^]	-0.139
Lip (g/día)	-0.107	-0.034	-0.039	-0.515*	0.162	-0.334	0.005
GS (g/día)	-0.119	-0.084	-0.099	-0.418[^]	0.240	-0.334	0.040
GMI (g/día)	0.032	-.031	0.056	-0.371[^]	0.096	-0.376[^]	-0.131
GPI (g/día)	-0.318	-0.073	-0.016	-0.440*	-0.105	-0.246	-0.080
GT (g/día)	-0.302	0.117	-0.238	-0.176	0.030	0.021	-0.288
Ω6 (g/día)	-0.153	-0.016	0.113	-0.274	0.034	-0.179	-0.072
Ω3 (g/día)	-0.053	-0.008	0.067	-0.313	.002	0.296	-0.047
Relación Ω6/Ω3	.023	0.102	0.208	0.040	0.162	0.003	-0.117

Análisis de correlación de Spearman (r_s). [^] Tendencia estadística: < 0.1 $P \geq 0.05$; * significancia estadística: $p < 0.05$. Abreviaturas: HC= hidratos de carbono; Az S: azúcares simples; Prot= proteína; Lip= lípidos; GS= grasa saturada; GMI=grasa monoinsaturada; GPI= grasa poliinsaturada; GT= grasa trans; Ω6= omega-6; Ω3= Omega- 3.

De manera preliminar se realizó un análisis bivariado entre las ceramidas plasmáticas y en tejido muscular contra el valor M del Clamp HE, con la finalidad de

identificar las ceramidas que pudieran tener un efecto potencial sobre la sensibilidad a la insulina para después ajustar por covariables en el análisis de regresión lineal. Las ceramidas plasmáticas C18:0 y C20:0 y las ceramidas de tejido muscular C18:1 y C20:0, mostraron una asociación inversa y significativa con la sensibilidad a la insulina. Sólo la ceramida muscular C18:0 tuvo una correlación positiva contra el valor M del Clamp (Tabla 10).

Cuadro 11. Asociación entre la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de ceramidas plasmáticas y en tejido muscular.

	Ceramidas plasmáticas (ng/ml)						
	Cer C14:0	Cer C16:0	Cer C18:1	Cer C18:0	Cer C20:0	Cer C24:1	Cer C24:0
Valor M (mg/kg · min)	0.049	-0.230	-0.327	-0.424*	-0.410*	-0.311	-0.184

	Ceramidas en tejido muscular (ng/mg tejido)						
	Cer C14:0	Cer C16:0	Cer C18:1	Cer C18:0	Cer C20:0	Cer C24:1	Cer C24:0
Valor M (mg/kg · min)	-0.011	-0.138	-0.474*	0.416[^]	-0.487*	0.384	0.155

Análisis de correlación de Spearman (r_s). [^] tendencia estadística: < 0.1 $P \geq 0.05$; * significancia estadística: $p < 0.05$

En los cuadros 11 y 12 se muestran los resultados más relevantes que obtuvimos después de ensayar varios modelos de regresión lineal considerando como variable dependiente el valor M del Clamp HE (mg/kg · min). En un inicio se había considerado el índice de masa corporal y la edad como variables de ajuste importante. Dado el pequeño rango de variación observado en ambas variables (desviación estándar IMC= ± 1.9 y edad [P25-P75]= 25 – 32 años), consideramos conveniente ajustar solamente por actividad física. El cuadro 11 muestra el resumen de resultados de los modelos correspondientes a las ceramidas plasmáticas. El valor global de P para el modelo de la ceramida C18:0 fue de

0.034. La actividad física reportó un coeficiente beta significativo de -0.986 y la ceramida C18:0 de -0.034. El modelo correspondiente a la ceramida C20:0 alcanzó tendencia estadística al igual que el coeficiente beta para esta ceramida (-0.013). Considerando que la variable dependiente en estos modelos de regresión es el valor M del Clamp, los signos de los coeficientes beta obtenidos fueron en la dirección esperada de acuerdo a las hipótesis planteadas.

Cuadro 12. Efecto de las ceramidas plasmáticas sobre la sensibilidad a la insulina. Modelo de regresión lineal múltiple.

Variable Dependiente: valor M del Clamp HE (mg/kg · min)				
	Cer C18:0 Plasma		Cer C20:0 Plasma	
R^2	0.245		0.171	
Sig.	0.034		0.087	
Variables Independientes	Beta	Sig.	Beta	Sig.
Ceramida (ng/ml)	-0.034	0.062	-0.013	0.077
Actividad Física [§]	-0.986	0.033	0.559	0.229

[§] Actividad Física: 0=sedentario (referencia), 1=leve, 2=moderado, 3=intenso.

El resumen de los modelos para las ceramidas de tejido muscular se muestra en el cuadro 12. Los modelos correspondientes a las ceramidas C18:1 y C20:0 alcanzaron un valor global de P menor a 0.1 con coeficientes de determinación de 0.255 y 0.273, respectivamente. El modelo de la ceramida C20:0 reportó niveles de tendencia estadística para esta ceramida, con un coeficiente beta de -0.334. El modelo de la ceramida C18:1 no

alcanzó significancia estadística para este compuesto, no obstante que el valor del coeficiente beta es de una magnitud aritmética importante: -1.091.

Cuadro 13. Efecto de las ceramidas plasmáticas sobre la sensibilidad a la insulina. Modelo de regresión lineal múltiple.

Variable Dependiente: valor M del Clamp HE (mg/kg . min)						
	Cer C18:0 Músculo		Cer C18:1 Músculo		Cer C20:0 Músculo	
R^2	0.235		0.255		0.273	
Sig.	0.118		0.095		0.078	
Independientes	Beta	Sig.	Beta	Sig.	Beta	Sig.
Ceramida (ng/mg tejido)	0.025	0.162	-1.091	0.123	-0.334	0.097
Actividad Física [§]	0.578	0.195	0.521	0.241	0.343	0.463

[§]Actividad Física: 0=sedentario (referencia), 1=leve, 2=moderado, 3=intenso.

En el cuadro 13 se muestran las correlaciones observadas entre las concentraciones de ceramidas plasmáticas y otras variables bioquímicas relacionadas al metabolismo lipídico. De manera interesante se obtuvieron correlaciones de moderadas a fuertes entre diversas ceramidas y otras de las variables estudiadas. A excepción de la ceramida C14:0, todas la demás correlacionaron significativamente con la concentración de triacilgliceroles y las lipoproteínas de muy baja densidad. Contra esta última se observaron los coeficientes de mayor magnitud que en algunos casos fueron superiores al 0.7. El colesterol total correlacionó positivamente con las ceramidas C16:0, C20:0, C24:1 y C24:0 y el colesterol

HDL de manera inversa con las ceramidas C18:1 y C18:0. Ninguna de las ceramidas correlacionó con las concentraciones de glucosa en ayuno.

Cuadro 14. Correlación entre las concentraciones de ceramidas plasmáticas y otras variables bioquímicas.

	Ceramidas plasmáticas (ng/ml)						
	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0	C20:0	C24:1	C24:0
Glucosa (mg/dl)	-0.122	-0.129	-0.337	-0.291	-0.026	-0.040	-0.042
TAG (mg/dl)	0.151	0.436*	0.474[^]	0.629**	0.596**	0.467*	0.394*
Colesterol (mg/dl)	-0.094	0.601**	0.384	0.234	0.368*	0.383[^]	0.501**
HDL (mg/dl)	-0.162	0.080	-0.570*	-0.309[^]	-0.150	-0.258	-0.077
VLDL (mg/dl)	0.213	0.553**	0.745**	0.752**	0.671**	0.581**	0.487**

Análisis de correlación de Spearman (r_s). Abreviaturas: TAG= triacilgliceroles; C-HDL: colesterol de alta densidad; C-VLDL= colesterol del muy baja densidad. [^] tendencia estadística: < 0.1 $P \geq 0.05$; * significancia estadística: $P < 0.05$; ** significancia estadística: $P < 0.01$.

Finalmente, en el cuadro 14 se muestran las correlaciones obtenidas en las ceramidas de tejido muscular contra las mismas variables bioquímicas examinadas en el cuadro anterior. En este caso se obtuvieron algunas correlaciones aisladas. Las ceramidas C18:0 se asoció directamente con los niveles de TAG y VLDL. Las concentraciones de HDL se asociaron positivamente con la ceramida C14:0 y C24:0. Sólo se observó una asociación inversa entre la ceramida C16:0 y el colesterol total. Cabe mencionar que no se observó ninguna correlación significativa entre las ceramidas de un mismo tipo cuantificadas en tejido plasmático y muscular (tabla no mostrada).

Cuadro 15. Correlación entre las concentraciones de ceramidas en tejido muscular y otras variables bioquímicas.

	Ceramidas en tejido muscular (ng/mg)						
	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0	C20:0	C24:1	C24:0
Glucosa (mg/dl)	-0.0185	-0.047	0.134	0.174	0.115	-0.029	0.017
TAG (mg/dl)	-0.141	-0.009	0.474*	-0.090	-0.008	-0.239	-0.197
Colesterol (mg/dl)	0.054	-0.379[^]	0.193	0.018	0.016	-0.253	-0.270
HDL (mg/dl)	0.410[^]	-0.050	0.064	0.238	0.261	-0.018	0.528*
VLDL (mg/dl)	-0.137	0.029	0.450*	0.019	0.040	-0.131	-0.173

Análisis de correlación de Spearman (r_s). Abreviaturas: TAG= triacilgliceroles; C-HDL: colesterol de alta densidad; C-VLDL= colesterol del muy baja densidad. [^] tendencia estadística: $< 0.1 \geq 0.05$; * significancia estadística: $P < 0.05$; ** significancia estadística: $P < 0.01$.

9. DISCUSIÓN.

El objetivo principal de este proyecto de investigación fue el de establecer la asociación entre el tipo de los lípidos ingeridos en la dieta y el perfil de ceramidas presentes en tejido plasmático y muscular. No obstante, no encontramos asociación entre las ceramidas plasmáticas y la ingesta de grasa saturada y monoinsaturada. Un fenómeno similar se observó en las ceramidas de tejido muscular; sólo la ceramida C18:0 mostró una correlación inversa con la ingesta de lípidos totales y otras familias lipídicas (cuadro 9). Sin embargo, sí se obtuvieron correlaciones entre diversas ceramidas plasmáticas y la ingesta de grasa poliinsaturada, particularmente con la ingesta de ácidos grasos omega-3 y de forma más consistente, con la relación omega-6/omega-3.

Debido a que la primera reacción en la biosíntesis de *novo* de las ceramidas es sustrato dependiente y altamente específica para ácidos grasos de 16 ± 1 carbonos, esperábamos una asociación directa con la ingesta lipídica de grasa saturada y/o monoinsaturada. Además, los ácidos, palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1) son los constituyentes lipídicos mayoritarios de los alimentos consumidos en México [16]. Hemos considerado que probablemente la ingesta ponderal de grasa saturada y monoinsaturada consumida por nuestros sujetos de estudio, no haya sido suficiente para denotar una asociación con las ceramidas estudiadas. Por ejemplo, la mediana de ingesta de grasa saturada fue de 24.1 g/día. Considerado el nivel de adecuación para este tipo de grasa (<10% ITE), el valor límite correspondiente a una ingesta máxima de 27 gramos al día. No obstante que el 45.7 % de los sujetos consumieron más grasa saturada de la que deberían (figura 7), la mediana de ingesta se situó por debajo del límite establecido. Una

situación similar se observó con la grasa monoinsaturada que tuvo una mediana de ingesta de 25 g/día y un valor límite de 27. De manera interesante, el estudio de Kien *et al* [18] que suministró dos tipos de dieta, una alta en ácido palmítico (16% ITE) y otra alta en ácido oleico (28.8% ITE) durante tres semanas, reportó diferencias significativas en la concentración de ceramidas totales en músculo al término de la intervención. Este régimen dietario utilizado por Klein, equivaldría a una ingesta mínima de 43.2 g/día de grasa saturada o de 77.7 g/día de grasa monoinsaturada. Es decir, 44.2 y 67.8% por arriba de la mediana de ingesta reportada por nuestros pacientes, respectivamente. La ausencia de asociación observada en nuestros resultados podría estar explicada por esta diferencia ponderal en la ingesta de grasa que fue insuficiente para generar un efecto sobre las concentraciones de ceramidas plasmáticas y de tejido muscular.

Resultan aún más difíciles de explicar las asociaciones observadas entre las ceramidas plasmáticas y la ingesta de ácidos grasos omega-3 y la relación omega-6/omega-3. Estructuralmente, estos ácidos grasos no son componentes de las ceramidas estudiadas. De igual manera, en términos de ingesta, sólo el ácido linoleico (C18:2 n-6) tendría una importancia cuantitativa; los ácidos grasos de la familia omega-3 (linolénico y DHA) se ingieren de manera insuficiente en la población (1.33 g/día). No obstante, parece ser que esta cantidad es suficiente para mostrar una asociación sobre las ceramidas estudiadas.

Está bien documentado que la ingesta de ácidos omega-3 tiene un efecto favorable sobre el metabolismo lipídico. Su ingesta se ha relacionado con una disminución de triacilglicérols y lipoproteínas de baja densidad y un aumento en las concentraciones de HDL [37]. De manera interesante, la ingesta de omega-3 y la relación de omega-6/omega-3

en nuestros sujetos de estudio, también correlacionó con los niveles de VLDL ($r_s = -0.302$, $P=0.087$ y $r_s = 0.398$, $P=0.022$, respectivamente). A su vez, los niveles de VLDL correlacionaron de manera contundente (en algunos casos con un coeficiente de correlación mayor a 0.7, cuadro 13) con las concentraciones de ceramidas plasmáticas. Esta información en su conjunto, sugiere una interacción entre la ingesta de omega-3, las concentraciones de VLDL y de las ceramidas plasmáticas. Debido a que el metabolismo de las lipoproteínas y las ceramidas tiene un lugar preponderante en hígado, una posible explicación a estos resultados podría estar en algún mecanismo regulatorio del metabolismo hepático. Se sabe en este tejido, las ceramidas incrementan la generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno que favorecen los procesos de apoptosis e inflamación. El flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado puede superar en un momento dado la capacidad oxidativa de éstos en el hepatocito, e incrementar la biosíntesis de ceramidas. Se ha propuesto un mecanismo interesante que sugiere que la exportación de ceramidas a través de las lipoproteínas de baja densidad podría ser una estrategia de este tejido para disminuir el efecto hepatotóxico de éstas [2]. En un estudio previo publicado por nuestro grupo de trabajo, demostramos la estrecha relación entre el hígado graso no alcohólico y los niveles circulantes de diversas ceramidas, que también correlacionaron con las lipoproteínas de muy baja densidad [33].

No obstante, la evidencia ampliamente difundida sobre el efecto benéfico de los ácidos grasos omega-3 en el metabolismo lipídico, consideramos que una contribución importante de este trabajo es el hallazgo descrito entorno a la ingesta de omega-3 y las concentraciones de ceramidas circulantes. Debido a los numerosos procesos fisiológicos y

trastornos metabólicos en los que las ceramidas se han visto implicadas, parecería que es deseable mantener sus concentraciones disminuidas.

Con respecto a otros de los macronutrientos estudiados, se observaron correlaciones significativas entre algunas ceramidas y la ingesta de hidratos de carbono y/o azúcares simples (Cuadro 8). Está bien descrito que el consumo elevado de estos nutrientes favorece los procesos de lipogénesis que incrementan la biosíntesis de ácidos grasos saturados de cadena media y de triacilgliceroles. La correlación observada entre la ingesta de azúcares simples y las ceramidas estudiadas, podría estar explicada parcialmente, por este mecanismo. Aas *et al* reportó recientemente que la hiperglucemia crónica favorece los procesos de lipogénesis en músculo. En células miofibrilares incubadas durante cuatro días en un medio a 20 mM de glucosa y libre de ácidos grasos, se observó que la síntesis de triacilgliceroles se incrementó en un 25% al igual que la actividad de la enzima diacilglicerol-aciltransferasa (34%). Asimismo, la conversión de ¹⁴C-glucosa a ácidos grasos libres, triacilgliceroles y ésteres de colesterol se elevaron en un 88, 44 y 89%, respectivamente [38]. De manera interesante, es notable el nivel de correlación observado entre todas las ceramidas plasmáticas (a excepción de la ceramida C14:0) y las concentraciones de triacilgliceroles (cuadro 13). Asimismo, se observó una asociación positiva entre la ingesta de azúcares simples y las concentraciones plasmáticas de TAG ($r=0.335$, $P=0.056$), lo que pudiera ser un indicio de una lipogénesis aumentada en nuestros sujetos de estudio.

Desde la génesis de este trabajo, nuestra aproximación al fenómeno que pretendíamos esclarecer, es decir, si la dieta desempeñaba o no un papel importante sobre

el perfil de las ceramidas presentes en el organismo humano, tuvo un enfoque primordialmente cuantitativo. Sin embargo, si observamos las concentraciones de las ceramidas analizadas en tejido plasmático y muscular con detenimiento, podremos observar que las subespecies constituidas por el ácido lignocérico (C24:0) y el ácido nervónico (C24:1) son muy abundantes en comparación con las ceramidas C14:0 y C18:1 (figura 8). Por ejemplo, las concentraciones promedio de la ceramida C24:1 es casi 400 veces más grande que la ceramida C14:0 del plasma y casi 140 veces mayor en el caso del tejido muscular. Paradójicamente, la cantidad de ácido lignocérico y nervónico en los alimentos, es prácticamente inexistente. A este respecto podríamos comentar, que, por ejemplo, el ácido oleico (C18:1) puede ser elongado en el organismo para formar ácido nervónico. De hecho, éste último conserva su doble enlace en la posición número nueve con respecto al grupo metilo terminal y sólo requeriría de la incorporación de 3 pares de átomos de carbono para su biosíntesis. Dado que el ácido oleico, representa casi la totalidad de la grasa monoinsaturada, la ingesta de este ácido graso podría tener algún efecto sobre sus productos finales de elongación. Sin embargo, este fenómeno no estaría estrictamente relacionado con la dieta, sino más bien con los mecanismos de biosíntesis que participan en el organismo. Tal vez el hecho de que la primera reacción en la síntesis de las ceramidas es sustrato dependiente, y que es la grasa saturada la que podría tener un mayor efecto sobre la activación de esta vía, ha contribuido a fomentar una visión reduccionista de este fenómeno. El único estudio previo que relaciona la ingesta lipídica y la biosíntesis de ceramidas realizado en seres humanos, consistió en el suministro controlado de una dieta alta en grasa saturada (C16:0) y otro grupo con una ingesta elevada de grasa

monoinsaturada (C18:1) [28]. Si bien, se observa un incremento en las ceramidas totales de tejido muscular en el grupo que ingirió por tres semanas la grasa saturada, no se comenta más sobre el efecto que pudiera haberse observado sobre las distintas variedades o subespecies de ceramidas musculares. Incluso, para la reglamentación de nuestro país pudiera ser inaceptable suministrar una dieta alta en grasa saturada debido a las implicaciones nocivas que pudiera tener en la salud de los participantes. Otro trabajo realizado en ratas, a las que también se suministró una dieta alta en grasa saturada y una dieta elevada en grasa poliinsaturada, demostró algunos efectos sobre las ceramidas y otros esfingolípidos en este mismo sentido. Parecería que un enfoque cuantitativo de la ingesta lipídica no esclarece mecanismos más finos relacionados a la biosíntesis de las ceramidas. Por ejemplo, se ha descrito que la enzima ceramida sintasa (3ª reacción de la biosíntesis de *novo*), de la cual se han reportado seis isoformas, se expresa en diferentes tejidos de acuerdo con las necesidades de función y estructura de cada uno de ellos. Esta enzima es la responsable de la gran diversidad de ceramidas presentes en el organismo. Su actividad no está supeditada a la cantidad de sustrato disponible sino más bien a un subtipo de ácido graso en particular que sea el adecuado para satisfacer necesidades específicas de función y/o estructura de algún tejido en particular.

Probablemente, una aproximación más minuciosa al estudio de la biosíntesis de las ceramidas y los mecanismos que la regulan, podría complementarse con un análisis detallado del perfil de ácidos grasos presentes en suero sanguíneo y la determinación de la actividad de la enzima ceramida sintasa mediante un radio producto/sustrato (dihidroceramida/dihidroesfingosina, figura 2). Estos dos intermediarios metabólicos

podrían cuantificarse en plasma sanguíneo por cromatografía de líquidos acoplada a masas con ligeras variaciones a las técnicas analíticas descritas previamente en la metodología de este trabajo. Si bien, el perfil de ácidos grasos en suero es un reflejo de la ingesta reciente de grasas en el organismo, también representa la composición de las reservas lipídicas almacenadas en el tejido adiposo que realiza un intercambio dinámico y constante con el hígado y otros tejidos de importancia como músculo, cerebro y corazón. Parece ser que aislar el efecto de los diversos componentes de la dieta sobre algunos mecanismos que tienen lugar en el organismo sigue siendo un reto. Sería interesante reflexionar sobre la validez de este aislamiento para dilucidar los fenómenos que suceden en un organismo vivo, producto de un sin número de reacciones e interacciones bioquímicas.

Con respecto al apartado de la sensibilidad a la insulina, los niveles de asociación observados en nuestro estudio son similares a los obtenidos por otros autores. Los coeficientes beta obtenidos de los análisis de regresión lineal sugieren un efecto importante sobre la sensibilidad a la insulina. Con rangos de concentración de 75.4 ng/ml para la ceramida C18:0 y de 243.6 ng/ml para la ceramida C20, un incremento de 1 ng/ml de estas ceramidas en plasma, representaría un decremento de 0.034 y 0.013 unidades del valor M del Clamp, respectivamente. En el caso de la ceramida C20:0 de tejido muscular, por un incremento de un 1 ng/mg se tendría una disminución de 0.334 unidades del Clamp, con un rango de concentración de 8.8 ng/mg de tejido para esta ceramida. Dado los rangos de concentración observados para las ceramidas estudiadas, las variaciones máximas en el valor M del Clamp podrían ser mayores a 2.5 puntos para las ceramidas plasmáticas y hasta

de 3 puntos para las ceramidas musculares. Estos datos sugieren un efecto importante de las ceramidas sobre la sensibilidad a la insulina, incluso en sujetos eutróficos y metabólicamente sanos, en los que, por esta condición, podrían esperarse efectos de menor magnitud.

Probablemente, el estudio publicado por Straczkowski *et al* (2004) en 27 varones polacos metabólicamente sanos, sea el trabajo más parecido al realizado por nuestro grupo de investigación en lo que respecta al apartado de la sensibilidad insulina. De hecho, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la magnitud de asociación reportada entre algunas ceramidas musculares y la sensibilidad a la insulina determinada por el Clamp HE: ceramidas totales ($r = -0.49$) y ceramidas C14:0, C16:0, C16:1 y C24:1 ($r = -0.42$, $r = -0.48$, $r = -0.45$ y $r = -0.39$). Asimismo, en el estudio de Francesca Amati *et al* realizado en adultos mayores estratificados en tres grupos: atletas ($n=14$), sujetos eutróficos ($n=7$) y sujetos con obesidad ($n=21$), también se observaron niveles de asociación similares a los reportados por nosotros entre diversas ceramidas agrupadas en diferentes factores (eigenvalores) versus la sensibilidad a la insulina: factor 1= ceramidas C24:0, C24:1, C18:0 y C20:9 ($r=-0.46$); factor 2= dihidroceramida C16:0 y ceramida C18:1 ($r=-0.47$); y factor 4= ceramida C14:0 ($r=0.38$). Finalmente, Kasumov *et al* reportaron una disminución en las concentraciones de ceramidas totales y la ceramida C14:0 en sujetos con obesidad y diabetes tipo 2 al término de una intervención de actividad física por doce semanas. La disminución de las ceramidas totales y la ceramida C14:0 se relacionaron inversamente con un aumento en la sensibilidad a la insulina (valor M del Clamp HE) con coeficientes de correlación de -0.51 y -0.56 , respectivamente. Toda esta información en su conjunto sugiere que las ceramidas

desempeñan un rol trascendental en los mecanismos de captación celular de glucosa en los tejidos insulino-dependientes. En todos los trabajos realizados (incluido el nuestro), se observan niveles de correlación similares, no obstante que existen algunas variantes en las poblaciones de estudio. Por ejemplo, los participantes del trabajo de Amati y Kasumov fueron adultos mayores con medias de edad de 66.2 ± 1.5 y 63.5 ± 2 años, respectivamente. En el caso Straczkowski, la muestra estuvo conformada únicamente por varones. Asimismo, el estudio de intervención de ingesta lipídica antes mencionado (Kien *et al*), mostró un efecto adverso sobre la sensibilidad a la insulina en el grupo que recibió una dieta alta en palmitato. Los resultados de esta investigación son concordantes con los reportados por diversos autores en poblaciones diversas.

Las fortalezas de este trabajo de investigación podrían estar explicadas en parte por aspectos metodológicos relacionados a las técnicas e instrumentos utilizados durante su desarrollo. Para determinar la sensibilidad a la insulina se utilizó el Clamp HE, así como la cromatografía de líquidos acoplada a masas (UPLC-MS/MS) para el análisis de ceramidas, considerada también el método de referencia para esta determinación. Adicionalmente, si bien ya se discutieron las limitaciones inherentes al estudio de la dieta, el diario de registro de alimentos de tres días podría ser la mejor alternativa para estimar la ingesta de nutrimentos bajo circunstancias de vida normales [19]. Además, el *software* con el que se realizó el análisis dietario fue complementado y actualizado con la información del libro “Grasas, dieta y salud” publicado por Salvador Villalpando *et al*. En este libro se describe la composición lipídica detallada de 261 alimentos que contribuyeron con el 80% de la

ingestión de grasa en la dieta de la población mexicana, según la información recabada de la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999 [16].

Por otro lado, consideramos que la limitación más importante de este trabajo es el tamaño de muestra resultante. De los 37 sujetos requeridos, según el cálculo inicial, se lograron reclutar 34 participantes (92%). De estos 34 se obtuvieron biopsias de tejido muscular en 21 de ellos (57% con respecto al cálculo original). El poder estadístico (error tipo II) alcanzado con la submuestra del tejido muscular de acuerdo con el cálculo de tamaño de muestra original corresponde a un valor aproximado de 60%. A pesar de esta limitante, se observaron resultados estadísticamente significativos en muchos de los eventos analizados con niveles de asociación similares a lo reportado por diversos autores. Consideramos útil mostrar los datos con tendencia estadística ($0.05 > P < 0.1$) como una forma de compensar la dificultad que se tuvo para reunir la totalidad de la muestra.

Otro aspecto relevante que podría ser considerado una limitación de esta investigación podría ser lo concerniente al tipo de diseño utilizado. En sus inicios consideramos la posibilidad de realizar un estudio longitudinal de intervención con diferentes familias lipídicas (grasa saturada, monoinsaturada y poliinsaturada). Sin embargo, dado los efectos metabólicos adversos generados por el consumo elevado de grasa saturada hubiera sido controversial asignar este régimen alimenticio a un determinado grupo de personas. En todo caso, se podría haber utilizado un diseño con dos grupos de estudio, uno con una dieta alta en grasa monoinsaturada y otro con una ingesta elevada de grasa poliinsaturada. No obstante, este diseño hubiera requerido la realización de dos Clamp HE y dos tomas de biopsias en cada paciente, por lo que factibilidad de

reclutar la muestra requerida se hubiera visto aún más comprometida. Asimismo, la manipulación de la ingesta lipídica no nos hubiera permitido conocer el efecto de una dieta convencional sobre las ceramidas estudiadas y describir su relación con la sensibilidad a la insulina en un escenario habitual. Ésta fue una inquietud que tuvimos desde el principio; deseábamos conocer las implicaciones metabólicas que tiene la alimentación de las personas en el contexto de su vida cotidiana y el nivel de riesgo al que podrían estar expuestos por vía de las ceramidas; moléculas implicadas de manera adversa en múltiples procesos fisiológicos.

10. CONCLUSIONES.

La ingesta de grasa saturada y monoinsaturada no correlacionó con los niveles de ceramidas plasmáticas ni de tejido muscular, a excepción de la ceramida C18:0 de músculo que mostró una correlación inversa con la ingesta de grasa total y las grasas saturada, monoinsaturada y poliinsaturada. No obstante, la ingesta de ácidos grasos omega-3 mostró una asociación inversa con diversas ceramidas plasmáticas (Cer C14:0, C18:1 y C18:0), así como una asociación directa con la relación de ingesta omega-6/omega-3 con las ceramidas C14:0, C16:0, C18:1, C18:0 y C20. Por otra parte, las ceramidas plasmáticas C18:1 y C20:0 y la ceramida C20:0 de tejido muscular, están fuertemente relacionadas con una disminución en la sensibilidad a la insulina incluso en sujetos eutróficos y metabólicamente sanos en los que, por esta condición, podrían esperarse efectos de menor magnitud. Adecuaciones en la ingesta lipídica, orientada sobre todo hacia un mayor consumo de ácidos grasos omega-3 y un consumo equilibrado de ácidos grasos omega-6 en la dieta, podría tener un efecto favorable sobre la sensibilidad a la insulina por vía de las ceramidas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 112.
2. Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., ... & Ramaraju, H. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), 1864-1884.
3. Pagadala, M., Kasumov, T., McCullough, A. J., Zein, N. N., & Kirwan, J. P. (2012). Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8), 365-371.
4. Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *The Journal of clinical investigation*, 110(1), 3-8.
5. Martínez A. Confiabilidad de la prueba de aliento con [13C] Glucosa para el diagnóstico de resistencia a la insulina. [Tesis de Maestría]. Ciudad de México: Universidad La Salle. Facultad de Ciencias Químicas; 2011.
6. Basila, A. M., Hernández, J. M., & Alarcón, M. L. (2011). Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68(5), 397-404.
7. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 237(3), E214.

8. Aradillas-García, C., Rodríguez-Morán, M., Garay-Sevilla, M. E., Malacara, J. M., Rascon-Pacheco, R. A., & Guerrero-Romero, F. (2012). Distribution of the homeostasis model assessment of insulin resistance in Mexican children and adolescents. *European journal of endocrinology*, 166(2), 301-306.
9. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care*. 1999 22: 1462-1470.
10. Straczkowski, M., Kowalska, I., Nikolajuk, A., Dzienis-Straczkowska, S., Kinalska, I., Baranowski, M., ... & Gorski, J. (2004). Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes*, 53(5), 1215-1221.
11. Adams, J. M., Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R. A., Sullards, M. C., & Mandarino, L. J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*, 53(1), 25-31.
12. Amati, F., Dubé, J. J., Alvarez-Carnero, E., Edreira, M. M., Chomentowski, P., Coen, P. M., ... & Goodpaster, B. H. (2011). Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes*, 60(10), 2588-2597.
13. Kasumov, T., Solomon, T. P., Hwang, C., Huang, H., Haus, J. M., Zhang, R., & Kirwan, J. P. (2015). Improved insulin sensitivity after exercise training is linked to reduced plasma C 14: 0 ceramide in obesity and type 2 diabetes. *Obesity*, 23(7), 1414-1421.
14. Summers, S. A., Garza, L. A., Zhou, H., & Birnbaum, M. J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Molecular and cellular biology*, 18(9), 5457-5464.

15. Hassan, R. H., Bourron, O., & Hajduch, E. (2014). Defect of insulin signal in peripheral tissues: important role of ceramide. *World journal of diabetes*, 5(3), 244.
16. Villalpando, S. (2007). *Grasas, dieta y salud: Tablas de composición de ácidos grasos de alimentos frecuentes en la dieta mexicana*. Instituto Nacional de Salud Pública.
17. Ramírez-Silva, I., Villalpando, S., Moreno-Saracho, J. E., & Bernal-Medina, D. (2011). Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 33.
18. Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 77(5), 1146-1155.
19. Thompson, F. E., & Subar, A. F. (2013). Dietary assessment methodology. *Nutrition in the prevention and treatment of disease*. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*, 2nd ed.; Coulston, AM, Boushey, C., Eds.
20. Warensjö, E., Sundström, J., Lind, L., & Vessby, B. (2006). Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men—. *The American journal of clinical nutrition*, 84(2), 442-448.
21. Poppitt, S. D., Kilmartin, P., Butler, P., & Keogh, G. F. (2005). Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids in Health and Disease*, 4(1), 30.

22. Orton, H. D., Szabo, N. J., Clare-Salzler, M., & Norris, J. M. (2008). Comparison between omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid intakes as assessed by a food frequency questionnaire and erythrocyte membrane fatty acid composition in young children. *European journal of clinical nutrition*, 62(6), 733.
23. Zhang, J. Y., Kothapalli, K. S., & Brenna, J. T. (2016). Desaturase and elongase limiting endogenous long chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 19(2), 103.
24. Rodríguez-Cruz, M., del Rocío Cruz-Guzmán, O., Almeida-Becerril, T., Solís-Serna, A. D., Atilano-Miguel, S., Sánchez-González, J. R., ... & Escobar-Cedillo, R. E. (2018). Potential therapeutic impact of omega-3 long chain-polyunsaturated fatty acids on inflammation markers in Duchenne muscular dystrophy: A double-blind, controlled randomized trial. *Clinical Nutrition*, 37(6), 1840-1851.
25. Bernabe-Garcia, M., Lopez-Alarcon, M., Villegas-Silva, R., Mancilla-Ramirez, J., Rodriguez-Cruz, M., Maldonado-Hernandez, J., ... & Lagunes-Salazar, S. (2016). Beneficial effects of enteral docosahexaenoic acid on the markers of inflammation and clinical outcomes of neonates undergoing cardiovascular surgery: an intervention study. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(1), 15-23.
26. López-Alarcón, M., Martínez-Coronado, A., Velarde-Castro, O., Rendón-Macías, E., & Fernández, J. (2011). Supplementation of n3 long-chain polyunsaturated fatty acid synergistically decreases insulin resistance with weight loss of obese prepubertal and pubertal children. *Archives of medical research*, 42(6), 502-508.

27. Di Marino, L., Maffettone, A., Cipriano, P., Sacco, M., Di Palma, R., Amato, B., ... & Rivellese, A. A. (2000). Is the erythrocyte membrane fatty acid composition a valid index of skeletal muscle membrane fatty acid composition? *Metabolism*, 49(9), 1164-1166.
28. Kien, C. L., Bunn, J. Y., Poynter, M. E., Stevens, R., Bain, J., Ikayeva, O., ... & Muoio, D. M. (2013). A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. *Diabetes*, 62(4), 1054-1063.
29. Munguía-Miranda, C., Sánchez-Barrera, R. G., Hernández-Saavedra, D., & Cruz-López, M. (2008). Prevalencia de dislipidemias en una población de sujetos en apariencia sanos y su relación con la resistencia a la insulina. *Salud Pública de México*, 50(5), 375-382.30.
30. Imamura, F., Mukamal, K. J., Meigs, J. B., Luchsinger, J. A., Ix, J. H., Siscovick, D. S., & Mozaffarian, D. (2013). Risk factors for type 2 diabetes mellitus preceded by β -cell dysfunction, insulin resistance, or both in older adults: the Cardiovascular Health Study. *American journal of epidemiology*, 177(12), 1418-1429.
31. Food and Agriculture Organization. (2004). Human energy requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 1, 35-50.
32. Kasumov, T., Huang, H., Chung, Y. M., Zhang, R., McCullough, A. J., & Kirwan, J. P. (2010). Quantification of ceramide species in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 401(1), 154-161.
33. Maldonado-Hernández, J., Saldaña-Dávila, G. E., Piña-Aguero, M. I., Núñez-García, B. A., & López-Alarcón, M. G. (2017). Association between Plasmatic Ceramides Profile and

AST/ALT Ratio: C14: 0 Ceramide as Predictor of Hepatic Steatosis in Adolescents Independently of Obesity. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2017.

34. de la Salud, P. (1987). Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud.

35. Mundial, A. M. (2019). Declaración de Helsinki de la AMM-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.

36. Tam, C. S., Xie, W., Johnson, W. D., Cefalu, W. T., Redman, L. M., & Ravussin, E (2012) Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes care*, DC_112339.

37. Elick, G. D., Howe, P. R., Smith, C., Priest, R., & Bensoussan, A. (2009). Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*, 136(1), 4-16.

38. Aas, V., Rokling-Andersen, M., Wensaas, A. J., Thoresen, G. H., Kase, E. T., & Rustan, A. C. (2005). Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia. *Acta Physiologica Scandinavica*, 183(1), 31–41.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera sincera a todas las personas que estuvieron involucradas en el desarrollo de este proyecto, sobre todo por su participación entusiasta y generosa. También agradezco a todos los voluntarios participantes por su colaboración y paciencia para el desarrollo de esta investigación.

Diseño experimental, análisis y asesoría:

- Dra. Mardia López Alarcón
- Dra. María E. Tejero Barrera.
- Dr. Carlos A. Aguilar Salinas.

Análisis de la dieta:

- L. N. Aranza Saldívar Delgado
- M en C. Mónica I. Piña Aguero
- L.N. Katia Morales Ramírez
- L. N. Alva B. Morales Villar

Toma de biopsia de vasto lateral:

- Dra. Zobeida Ventura Bravo

Clamp Hiperinsulinémico - Euglicémico:

- Biol. Rocío Sánchez Armas
- Dra. Aly Sugei B. Vázquez
- José R. Betancourt Navarro
- Enf. Yazmín González Cifuentes
- Dra. Naomi Franco Medrano
- Dr. Víctor Israel Acosta Flores

Determinaciones bioquímicas y análisis

instrumental:

- I.B.A. Benjamín Núñez García
- Q.F.B. Filiberto Jasso Saavedra
- Dr. Salvador Flores Chávez
- L.N. Araceli Ruiz Waiss