



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Impacto de la combinación de alimentos basados en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) sobre un modelo de obesidad: su efecto sobre el estrés oxidante en hígado y tejido adiposo

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

### **PRESENTA:**

M. en C. AZALIA AVILA NAVA

### **TUTOR PRINCIPAL**

Dra. Nimbe Torres y Torres

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Cristina Fernández Mejía

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química

Ciudad de México. Diciembre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *Agradecimiento*

Se agradece al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), por el apoyo brindado para la asistencia al congreso internacional “Experimental Biology 2015” que se llevó a cabo en Boston, Massachusetts en EUA.

## *Agradecimientos especiales*

*A la Dra. Nimbe Torres y Torres por el gran apoyo como asesora, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por brindarme su confianza para llevar a cabo este proyecto de investigación.*

*Al Dr. Armando Tovar Palacio por permitirme formar parte del departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ y por la confianza brindada.*

*A los miembros de mi comité tutor la Dra. Cristina Fernández Mejía y al Dr. José Pedraza-Chaverri por los comentarios y el apoyo que me brindaron durante los 4 años de evaluación.*

*A los miembros del jurado, Dra. María Amanda Galvez Mariscal, Dra. Amelia Farrés González-Saravia, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y Dra. María Elena Ibarra Rubio por el tiempo brindado a la revisión del presente trabajo.*

*A la asistente de procesos del posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM, Leticia García Gutiérrez por todo su apoyo en los trámites académicos y su comprensión durante estos 4 años.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 Modificaciones en los patrones de alimentación en México</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Obesidad</b>	<b>2</b>
1.2.1 Modificaciones en el tejido adiposo blanco durante la obesidad	3
1.2.2 Relación de los miRNA con la obesidad	6
1.2.3 Alteraciones metabólicas en el hígado causadas por la obesidad	7
<b>1.3 Generación de estrés oxidante durante la obesidad</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Asociación de la obesidad con el daño cognitivo</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Alteraciones en la microbiota por la obesidad</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Alimentos funcionales</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	
<b>5.1.Elaboración de dietas y análisis de dietas</b>	<b>18</b>
5.1.1 Preparación de dietas	21
5.1.2 Determinación del perfil de ácidos grasos en las semillas de chía y de calabaza y en las dietas utilizadas en el protocolo	21
5.1.3 Análisis de la composición química de las dietas	22
5.1.4 Determinación de la actividad antioxidante en los alimentos utilizados en el protocolo mediante el método ORAC	23
<b>5.2 Diseño experimental</b>	<b>24</b>
5.2.1 Animales de experimentación	24
<b>5.3 Determinación de parámetros bioquímicos y metabólicos en el modelo animal</b>	<b>26</b>
5.3.1 Determinación de parámetros bioquímicos en suero	26
5.3.2 Determinación de la tolerancia a la glucosa mediante una curva de tolerancia a la glucosa vía intraperitonea	27
5.3.3 Determinación del gasto energético mediante calorimetría indirecta	27

5.3.4	Análisis histológicos	28
5.3.5	Determinación de la abundancia del ARNm	29
5.3.6	Extracción del ARN	29
5.3.7	Generación del ADNc mediante la reacción de transcripción	30
5.3.8	PCR en tiempo real	30
5.3.9	Extracción de miRNA	31
<b>5.4</b>	<b>Determinación de la abundancia de proteínas en diferentes tejidos mediante Western blot</b>	<b>32</b>
<b>5.5</b>	<b>Extracción de triglicéridos y colesterol en tejido hepático y adiposo</b>	<b>33</b>
<b>5.6</b>	<b>Determinación de marcadores de estrés oxidante</b>	<b>33</b>
5.6.1	Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido hepático	34
5.6.2	Determinación de lipoperoxidación mediante la cuantificación del malondialdehído	34
5.6.3	Determinación de proteínas oxidadas	36
5.6.4	Determinación de las concentraciones de glutatión	37
<b>5.7</b>	<b>Evaluación de la memoria espacial</b>	<b>38</b>
<b>5.8</b>	<b>Determinación de la modificación de la microbiota intestinal y niveles de GIP y LPS</b>	<b>38</b>
5.8.1	Extracción de DNA de heces	39
5.8.2	Determinación de los niveles de GIP y LPS	39
<b>6.</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<b>7.1</b>	<b>Análisis de la composición química, actividad antioxidante, compuestos antioxidantes y perfil de lípidos en la dietas y en los componentes de la DTM</b>	<b>40</b>
<b>7.2</b>	<b>El consumo de la DTM disminuyó la ganancia de peso corporal y las alteraciones bioquímicas producidas por la obesidad</b>	<b>44</b>
<b>7.3</b>	<b>La DTM disminuyó la intolerancia a la glucosa e incrementó el gasto energético en un modelo de obesidad</b>	<b>46</b>
<b>7.4</b>	<b>Modificaciones en el tejido hepático debido al consumo de la DTM</b>	<b>48</b>
7.4.1	El consumo de la DTM redujo el daño hepático y moduló la abundancia de ARNm de genes involucrados en lipogénesis, de enzimas antioxidantes e inflamación en tejido hepático	48
7.4.2	La DTM modificó la abundancia de proteínas involucradas en lipogénesis y señalización de insulina en el hígado	49
<b>7.5</b>	<b>La DTM disminuyó el estrés oxidante en tejido hepático</b>	<b>51</b>
<b>7.6</b>	<b>La DTM promueve una disminución de estrés oxidante y daño cognitivo en cerebro</b>	<b>52</b>
<b>7.7</b>	<b>Análisis del tejido adiposo blanco</b>	<b>53</b>
7.7.1	El consumo de la DTM mejoró la funcionalidad del tejido adiposo	53

blanco y redujo el tamaño de los adipocitos	
7.7.2 LA DTM moduló la abundancia de ARNm de genes involucrados en proceso de lipogénesis, beta oxidación y adipocinas en tejido adiposo blanco	54
7.7.3 La DTM incrementó la abundancia de proteínas involucrados en proceso de lipogénesis, beta oxidación y termogénesis en tejido adiposo blanco	56
7.7.4 La DTM indujo el aumento en la abundancia de miR-27b relacionado con el proceso de lipogénesis en tejido adiposo blanco	56
<b>7.8 La DTM generó modificaciones en la microbiota y en los niveles de GIP y LPS</b>	<b>57</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 3</b>	<b>81</b>

## ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	Dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)
<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ACC</b>	Acetil co-A carboxilasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AIN-93</b>	Dieta control
<b>AIN-93 → AIN-93</b>	Grupo que consumió dieta control durante todo el protocolo
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>P-AKT</b>	Proteína cinasa B fosforilada
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido de ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido de ribonucleico mensajero
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CPT1</b>	Carnitina palmitoiltransferasa 1
<b>DAG+S</b>	Dieta alta en grasa y 5% de sacarosa en agua
<b>DAG+S → DAG+S</b>	Grupo que consumió DAG+S durante todo el protocolo
<b>DAG+S → AIN-93</b>	Grupo que consumió DAG+S y después dieta control
<b>DAG+S → DTM</b>	Grupo que consumió DAG+S y después DTM
<b>DCD-FDA</b>	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
<b>DNP</b>	Dinitrofenilhidrazina
<b>DTM</b>	Combinación de alimentos basados en una dieta tradicional mexicana (prehispánica).
<b>DTNB</b>	Sulfhidrilo 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico)
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EO</b>	Estrés oxidante
<b>ER</b>	Especies reactivas
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>GIP</b>	Péptido insulínico dependiente de glucosa



<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HDL</b>	Colesterol de alta densidad
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>INCMNSZ</b>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
<b>JAK2</b>	Proteína cinasa Janus 2
<b>LDL</b>	Colesterol de baja densidad
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>1M2F</b>	1-metil-2 fenilindol
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorbanza de los radicales de oxígeno
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGC1- <math>\alpha</math></b>	Co-activador de proliferadores de peroxisomas $\alpha$
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	Receptor activado por el proliferadores de peroxisomas $\alpha$
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por el proliferadores de peroxisomas $\gamma$
<b>RER</b>	Coficiente de recambio respiratorio
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RIPA</b>	Amortiguador para un ensayo de radio inmunoprecipitación
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>ROO•</b>	Radical peroxilo
<b>SREBP-1c</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAP</b>	Tejido adiposo pardo
<b>Tbx-1</b>	Factor de transcripción T box 1

**TNB**

5-tio-2-nitrobenzoico

**TNF- $\alpha$**

Factor de necrosis tumoral alfa

**UCP-1**

Proteína desacoplante 1

## RESUMEN

**Introducción:** La alimentación en la época prehispánica se basaba principalmente en el consumo de verduras, leguminosas y en una menor proporción alimentos de origen animal, por lo que la dieta contenía una mayor proporción de fibra, micronutrientes y un menor contenido de grasa en general. Entre los alimentos incluidos en esta dieta se encontraban el maíz, el frijol, el jitomate, el nopal y las semillas de chía y de calabaza. Actualmente existen modificaciones en los patrones de alimentación de la población mexicana, los cuales involucran una disminución en el consumo de frutas y verduras, y un aumento en el consumo de alimentos con cantidades elevadas de grasas y carbohidratos, y esto se ha asociado a la generación de obesidad y alteraciones metabólicas en los mexicanos. **Hipótesis:** Si la combinación de alimentos basadas en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) contiene diversos compuestos funcionales, entonces disminuirá algunas anomalías bioquímicas generadas en la obesidad, al regular la abundancia del ARNm de genes involucrados en la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos, además de disminuir los marcadores de estrés oxidante e inflamación y aumentar el sistema antioxidante endógeno en tejido hepático y adiposo. **Metodología:** Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Sprague Dawley (150 g); el protocolo se llevó a cabo en dos etapas. Durante la primera etapa (inducción de obesidad), el grupo de inducción de obesidad (n=18) fue alimentado con una dieta alta en grasas + 5% de sacarosa en el agua (DAG+S) durante 6 meses. En este periodo también se tuvo un grupo control (n=6) que consumió una dieta control (AIN-93). En la segunda etapa (intervención dietaria) con 3 meses de duración el grupo que fue alimentado con la DAG+S fue subdividido en 3 grupos (n=6, c/ grupo), los cuales consumieron una de las siguientes dietas: 1) DAG+S, 2) dieta control (AIN-93) y 3) DTM, la cual contenía maíz, frijol, jitomate, nopal, semillas de chía y de calabaza; en esta etapa el grupo control siguió consumiendo la dieta control. Todas las dietas fueron administradas en forma sólida. **Resultados:** El consumo de la DTM disminuyó la ganancia de peso corporal y la concentración sérica de triglicéridos, glucosa y leptina. Así mismo el consumo de la DTM tuvo un efecto sobre el metabolismo de

carbohidratos al disminuir significativamente la intolerancia a la glucosa y disminuir los niveles de insulina. En el tejido hepático la DTM disminuyó la acumulación de lípidos lo que se asocia a la disminución la abundancia del RNAm de *SREBP-1c*, sin cambios en la abundancia del RNAm de genes involucrados en la oxidación de lípidos como *PPAR-α* y *CPT-1* en el hígado. En éste mismo tejido, el consumo de la DTM disminuyó la cantidad de especies reactivas, la concentración de proteínas oxidadas y la relación GSSG/GSH, así como también produjo un aumento de la abundancia del RNAm de la *Catalasa*. El consumo de la DTM mejoró la morfología del tejido adiposo blanco, lo cual se asoció a la disminución de la abundancia del RNAm de *ChREBP*. Estas modificaciones en el tejido adiposo blanco en el grupo de la DTM se relacionaron con el incrementó el gasto energético, lo cual se asoció al aumento en la abundancia de las proteínas como UCP-1, Tbx1, PPAR-α y PGC1-α. Por otra parte, el consumo de la DTM provocó modificaciones en la composición de la microbiota intestinal ya que generó una disminución significativa de los *Firmicutes*, y un aumento de probióticos como los *Bacteroidetes* y principalmente de las *Bifidobacterias*. Finalmente, las ratas obesas que consumieron la DTM disminuyeron el daño cognitivo. **Conclusiones:** El consumo de la DTM disminuyo las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, así como también las alteraciones metabólicas como la tolerancia a la glucosa y aumentó el gasto energético. Sobre la abundancia del RNAm se observó que la DTM disminuyó genes involucrados en la lipogénesis (*SREBP-1c* y *ChREBP*), inflamación (*TNF-α* e *IL-6*) e incrementó la abundancia del RNAm de la *Catalasa*. Además la DTM redujo considerablemente marcadores de estrés oxidante como las concentraciones de MDA, proteínas oxidadas y la relación GSSG/GSH.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Modificaciones en patrones de alimentación en México

La alimentación en la época prehispánica se basaba principalmente en el consumo de verduras, leguminosas, frutas y en una menor proporción los alimentos de origen animal. Esta dieta contenía una mayor proporción de fibra y micronutrientes y un menor contenido de grasa en general. Dentro de los alimentos que se consumían principalmente se puede mencionar la trilogía maíz-frijol-chile, a la cual habría que agregar las calabazas, de cuya planta se comen los frutos, las semillas y las flores. Además, otros de los alimentos básicos en la época prehispánica fueron chayotes, jitomates y tomates (1), así como también insectos como fuente de proteínas y minerales (2). Uno de los aspectos más importantes de la cocina prehispánica es que no se acostumbraba freír los alimentos, pues no disponían de aceites vegetales ni de mantecas animales (1).

Sin embargo, a través de los años se generaron diversas modificaciones en la alimentación, particularmente por la adopción patrones dietarios debido a la aculturación alimentaria (3). Este proceso es multidimensional, dinámico y complejo ya que depende de diversas modificaciones culturales y ambientales. Estos cambios en la alimentación involucran un aumento en el consumo de grasas saturadas, ácidos grasos omega-6 y carbohidratos refinados, así como una disminución de la ingesta de ácidos grasos omega-3, carbohidratos complejos, fibra, frutas, verduras, antioxidantes y minerales, aunado a la disminución de la actividad física (4, 5).

Lo anterior es gran importancia, ya que estas modificaciones en la alimentación a nivel mundial han generado un ambiente nutricional que difiere de aquél para el que fue seleccionada nuestra constitución genética (6). Los estudios sobre los aspectos evolutivos indican que los cambios más importantes han tenido lugar en la dieta, sobre todo en el tipo y la cantidad de ácidos grasos esenciales, así como en el contenido de antioxidantes de los alimentos. Estas modificaciones en la alimentación han generado una mala adaptación evolutiva que conduce al

aumento de la prevalencia de diversas enfermedades crónicas como la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes y la obesidad (7).



Figura 1. Consumo y cultivo de las principales fuentes de alimentos como el maíz y frijol (8).

## 1.2 Obesidad

El consumo de una dieta adecuada en nutrientes permite que se puedan regular múltiples procesos celulares, los cuales modulan tanto el adecuado almacenamiento de lípidos y también la utilización de carbohidratos como fuente de energía de acuerdo al estado fisiológico del organismo (9, 10).

Por otro lado, el consumo de dietas ricas en grasa y carbohidratos resulta en un exceso de ingesta de energía, lo cual promueve la alteración de múltiples procesos metabólicos y finalmente la generación de obesidad (11, 12). La obesidad se define como la acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud (Organización Mundial de la Salud, 2012). Algunos factores involucrados en la obesidad son el aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos, así como también el riesgo de presentar diabetes mellitus tipo 2 (DT2) (13).

La acumulación excesiva de tejido adiposo genera alteraciones en los mecanismos que regulan el metabolismo de carbohidratos y el equilibrio de los lípidos, así como la generación de resistencia a la insulina (RI) (14).

La insulina es una hormona que es secretada por las células  $\beta$  del páncreas y que es capaz de regular el tipo de sustrato que será utilizado de acuerdo al estado metabólico. En el post-prandio, cuando hay una ingesta de alimentos, los niveles de insulina se incrementan, lo que promueve la oxidación de carbohidratos como primera fuente de energía, incrementando los niveles de piruvato, que a su vez incrementa el malonil-CoA. Este último es un inhibidor de la acetil CoA carboxilasa (ACC), la cual es una enzima limitante en el metabolismo de lípidos (15). En el ayuno los niveles de insulina disminuyen, lo cual permite que el glucagón estimule la lipólisis de triglicéridos en el tejido adiposo y por lo tanto aumenta la liberación de ácidos grasos a la circulación para ser utilizados como fuente de energía. Debido a ello, en el ayuno la mayor fuente de energía es proveniente de la  $\beta$ -oxidación. Estos son los mecanismos por los cuales se seleccionan los sustratos que serán utilizados como fuente de energía, sin embargo cuando existe RI, la insulina no es capaz de ejercer su acción de señalización y no existe una adecuada selección en el uso de sustratos dependiendo del estado fisiológico, proceso al cual se le ha denominado inflexibilidad metabólica (16).

### **1.2.1 Modificaciones en el tejido adiposo blanco durante la obesidad**

El tejido adiposo se puede clasificar en tejido adiposo blanco (TAB), tejido adiposo pardo (TAP) y actualmente se sabe que existe un tercer tipo que se denomina tejido adiposo beige, cada uno de ellos tiene un papel importante en la regulación metabólica.

Una de las principales funciones del TAB es la capacidad de almacenar y liberar energía en forma de ácidos grasos cuando existen intervalos prolongados de ayuno. En la obesidad se promueve una excesiva acumulación de lípidos en los

adipocitos (unidad estructural del tejido adiposo), lo que produce alteraciones en la estructura del TAB, como la hiperplasia y la hipertrofia. En la hiperplasia existe un aumento del número de adipocitos, mientras que en la hipertrofia hay un aumento en el tamaño de los adipocitos (17). Debido a estas modificaciones el proceso de lipólisis en ayuno se ve alterado, ya que hay aumento en la liberación de lípidos y metabolitos intermedios provenientes de los adipocitos hipertróficos (18).

Se sabe que otra de las principales funciones del TAB es la capacidad de secretar moléculas denominadas adipocinas. Las adipocinas como la leptina y adiponectina, son proteínas secretadas por el tejido adiposo como factores endocrinos, las cuales señalizan a diferentes tejidos periféricos como el cerebro, músculo y el propio tejido adiposo. Dentro de las funciones que regulan estas adipocinas se encuentran la homeostasis de la glucosa, regulan el apetito, así como también intervienen en la regulación del gasto energético.

La leptina es una adipocina que regula el metabolismo energético, al producir la sensación de saciedad. La regulación de esta adipocina es a través de su receptor, el cual se une a la proteína cinasa Janus 2 (JAK2, por sus siglas en inglés) y fosforila al factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés), el cual se transloca al núcleo para inducir la expresión de genes que participan en la  $\beta$ -oxidación, como al gen que codifica para la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1, por sus siglas en inglés) y al receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) (Figura 2). Durante la obesidad, la expresión y la concentración de la leptina en diferentes tejidos se asocia directamente con los cambios de peso corporal (19).



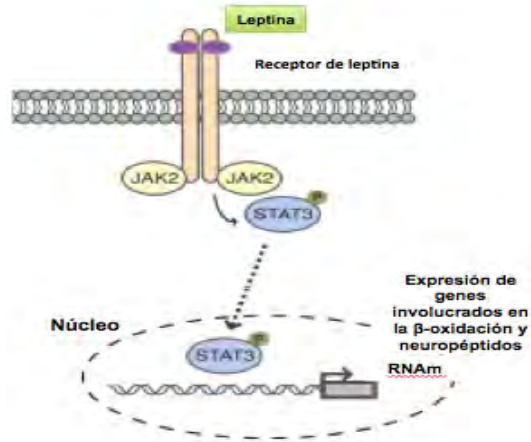


Figura 2. Vía de señalización de la leptina. La leptina se une a su receptor promoviendo la unión de la proteína cinasa Janus 2 (JAK2) y fosforila al factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el cual se transloca al núcleo para inducir la expresión de genes (tomado y modificado de (20)).

La adiponectina ejerce efectos en distintas rutas metabólicas, ya que favorece la sensibilidad a la insulina; así como también disminuye la afluencia de ácidos grasos no esterificados, aumenta la oxidación de los mismos y tiene efectos benéficos sobre la arteriosclerosis debido a que atenúa los efectos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) (21). Se ha demostrado que la concentración de adiponectina está disminuida en patologías como la obesidad y la DT2 (22).

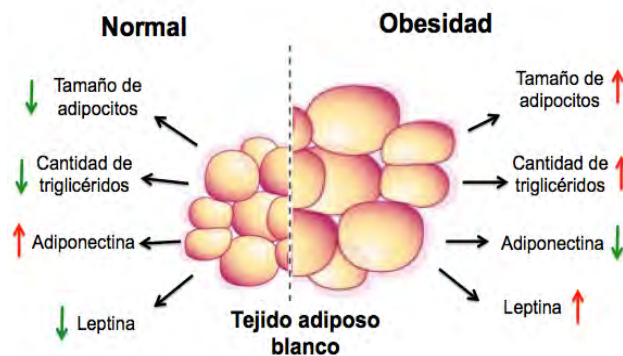


Figura 3. Modificaciones en tejido adiposo blanco durante la obesidad. Aumento de tamaño, cantidad de adipocitos y en los niveles de triglicéridos y leptina, así como la disminución de adiponectina (19) .

Una de las principales funciones del TAP es llevar a cabo procesos como la termogénesis (23). La termogénesis es el proceso mediante el cual se genera calor a partir del desacople del gradiente de electrones. Lo anterior resulta en la disipación de energía en forma de calor. Este proceso ocurre debido a la activación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1, por sus siglas en inglés) (24, 25).

Diversos estudios han demostrado la plasticidad del tejido adiposo, ya que bajo ciertos estímulos el TAB puede generar ciertas características del TAP originando un nuevo tejido, al cual se le ha denominado tejido adiposo beige (26-28). El tejido beige es un órgano que tiene características del TAB, pero contiene mayor cantidad de mitocondrias. Para la generación de este tejido, los adipocitos se activan mediante diversos estímulos como el frío, por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, o algunos compuestos bioactivos como los polifenoles. Esta activación promueve el aumento en la cantidad de mitocondrias, favorece la oxidación de lípidos y aumenta el gasto energético al incrementar la abundancia de proteínas como UCP-1, PPAR- $\alpha$  y PGC1- $\alpha$ , las cuales están involucradas en procesos como termogénesis y  $\beta$ -oxidación (23). Por lo anterior, la generación de tejido adiposo beige puede ser utilizada como estrategia para disminuir algunas de las complicaciones presentes en la obesidad, ya que se podría prevenir el desarrollo excesivo de adipocitos blancos y aumentar la cantidad de adipocitos beige.

### **1.2.2 Relación de los miRNA con la obesidad**

Otras de las moléculas que también han ganado gran importancia en la regulación del tejido adiposo son los micro-RNA (miRNA), los cuales intervienen en la regulación de la expresión génica. Los miRNA son RNA pequeños de longitud de 18 a 25 nucleótidos. Éstos son secuencias no codificantes que tienen una función importante en la regulación de genes y actúan predominantemente a nivel post-transcripcional (29). Los mecanismos por los cuales los miRNA pueden actuar a través de la disminución de la concentración de RNA, al unirse

complementariamente a las secuencias codificantes, lo que provoca la acumulación de las mismas, lo que provoca la disminución del proceso de traducción.

La expresión de los miRNA cambia bajo diversas condiciones patológicas, por lo cual se podrían considerar como biomarcadores útiles para el diagnóstico y el pronóstico. Actualmente se han identificado diferentes miRNA que pueden estar asociados a la generación de diversas patologías como es la obesidad (30-32). Uno de estos miRNA, es el miR-27b que está asociado con la regulación del proceso de adipogénesis, ya que disminuye la expresión del factor de transcripción PPAR- $\gamma$  en el TAB (33). Estudios recientes han demostrado que diferentes componentes de la dieta, como los lípidos (34) y los polifenoles (35) pueden modular la expresión de los miRNA, promoviendo un efecto benéfico sobre diversas alteraciones metabólicas.

### **1.2.3 Alteraciones metabólicas en el hígado causadas por la obesidad**

El hígado también tiene un papel importante en la homeostasis del metabolismo de lípidos y carbohidratos. Debido al consumo elevado de carbohidratos y lípidos se promueve una mayor acumulación de lípidos en el organismo en general. Durante la obesidad se aumenta el proceso de lipólisis del TAB, lo que produce un aumento en la liberación de ácidos grasos libres. Lo anterior genera un estrés metabólico causado por la excesiva ingesta de nutrientes, que resulta en una respuesta inflamatoria y en el aumento de estrés oxidante. Lo anterior puede conducir a la RI, al aumento de la movilización de triglicéridos y la disminución de la absorción de los ácidos grasos en los adipocitos (36). Estos factores aunados a la predisposición genética, a ciertos factores ambientales y al estilo de vida sedentario, pueden ser considerados como una causa importante de la generación de hígado graso. El exceso de ácidos grasos circulantes, además de la hiperinsulinemia promueve el incremento de acil-Co; esta acumulación induce procesos como lipogénesis y disminuye el catabolismo de los mismos ( $\beta$ -

oxidación), lo que finaliza en la acumulación excesiva de ácidos grasos en tejido hepático. Además el incremento en los niveles de insulina induce al factor de transcripción proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c, por sus siglas en inglés), el cual está involucrado en la expresión de genes lipogénicos como la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés) lo que induce un aumento en la síntesis de lípidos y generación de estrés oxidante (37). Sin embargo, esta patología no solo se debe a la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. Actualmente se sabe que otros procesos como el estrés oxidante, la peroxidación de lípidos, la muerte celular y la inflamación desempeñan un papel importante en el aumento de la saturación de la membrana, lo que puede alterar profundamente la homeostasis celular, la función de los receptores de membrana, los canales y los transportadores (37).

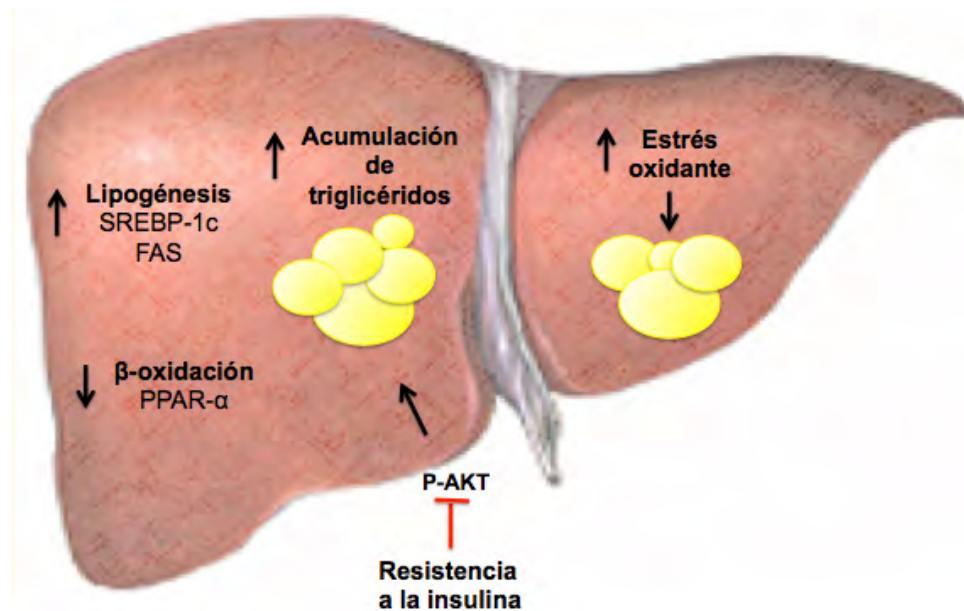


Figura 4. Modificaciones en el hígado durante la obesidad. La generación de resistencia a la insulina y estrés oxidante son procesos que promueven la acumulación de triglicéridos en tejido hepático, además de una desregulación entre los procesos de lipogénesis y  $\beta$ -oxidación.

### **1.3 Generación de estrés oxidante durante la obesidad**

El estrés oxidante (EO) es un proceso en el cual existe un desequilibrio entre factores pro-oxidantes y los antioxidantes encargados de eliminar dichas especies reactivas (ER) (38). El EO puede ser provocado por la disminución en la transcripción o actividad del sistema enzimático celular, en el que se encuentran enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y/o antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E. En el EO también están involucrados procesos como la producción excesiva de ER provenientes de diferentes fuentes, así como la activación del sistema de defensa “natural”, y/o del proceso inflamatorio (39). Las ER generan EO, lo cual produce alteraciones en la estructura de los tejidos alterando su función. El aumento en la producción de ER y en la concentración de triglicéridos plasmáticos (hipertrigliceridemia) provocan la oxidación de lípidos, así como también la RI, lo que induce el desarrollo de DT2 (40). Estas modificaciones están involucradas en el desarrollo de diversas patologías y/o complicaciones de las mismas (41), dentro de las cuales se encuentran la obesidad (42), la DT2 (39) y enfermedades neurodegenerativas (43, 44).

### **1.4 Asociación de la obesidad con el daño cognitivo**

Diversos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que el EO y la respuesta inflamatoria presentes en la obesidad (43, 44) puede estar estrechamente relacionada con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, alteraciones neuronales y deterioro cognitivo (45-48).

El cerebro es un órgano que está formado por una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, lo cual lo hace especialmente vulnerable a las ER. Además, este tejido tiene un sistema antioxidante que es relativamente deficiente, lo cual promueve la generación de EO. En la obesidad se genera un EO debido al consumo de dietas altas en lípidos y carbohidratos, lo que está relacionado con

múltiples formas de daño oxidante como la oxidación de lípidos y proteínas. Estos procesos están asociados con el deterioro cognitivo y la disfunción celular en el cerebro, lo cual involucra deterioro en las habilidades cognitivas como aprendizaje y la memoria (47, 49).

## **1.5 Alteraciones en la microbiota por la obesidad**

En la obesidad existen diversas alteraciones metabólicas que están involucrados con el aumento de peso y de tejido adiposo. Actualmente existen diferentes estudios tanto en animales como en humanos que han aumentado la evidencia de la relación que existe entre diversos procesos metabólicos y las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (50-52). La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos residentes en el organismo. En el intestino grueso la cifra de microorganismos se eleva de  $10^{12}$  a  $10^{14}$  (53), dentro de los más importantes se encuentran los *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacterias* y *Proteobacteria* (54). Esta composición de la microbiota puede ser alterada por diversos factores dentro de los cuales se encuentran el uso de antibióticos y las dietas altas en grasa y carbohidratos (55, 56). El consumo de dietas altas en grasas genera diversas modificaciones en la composición de la microbiota, como el aumento de *Firmicutes* y *Proteobacteria*, y una disminución de *Bacteroidetes* (57). Estas alteraciones en la biodiversidad de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del hospedero, se ha denominado disbiosis. La disbiosis se ha asociado con diferentes patologías como la DT2 y la obesidad (58, 59). Además, las modificaciones en la microbiota intestinal también se han asociado a diversos procesos metabólicos como la oxidación de la glucosa y de los lípidos, además de modular procesos encargados de la regulación del apetito (60), además de que está relacionado con alteraciones en la motilidad intestinal, la absorción de minerales y la activación del sistema inmune generando el aumento de moléculas inflamatorias (61). Lo anterior sugiere que alimentación tiene un papel muy importante en la regulación de la microbiota. Debido a ello, se han

buscado estrategias dietarias para restablecer la microbiota y una de ellas es el consumo de prebióticos. Los prebióticos se definen como ingredientes alimentarios no digeribles como las fibras solubles e insolubles, que generan efectos benéficos al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de diversas bacterias intestinales (62) dentro de las cuales se encuentran los *Bacteroidetes*. Éstos están dentro de los principales microorganismos intestinales que pueden metabolizar compuestos naturales como la fibra dietaria y los polifenoles (63), los cuales están presentes en diversos alimentos, tales como semillas, verduras y frutas (64).

Otra de las estrategias para modular la microbiota puede ser el consumo de probióticos. Los probióticos se definen como microorganismos vivos, los cuales, cuando se administran en cantidades adecuadas, pueden aportar un beneficio a la salud (65). *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los principales probióticos a los cuales se les han adjudicado efectos benéficos como disminución de peso corporal y del TAB (66, 67).

## **1.6 Alimentos funcionales**

Debido a la relación que existe entre la prevalencia de diferentes patologías y las alteraciones en los patrones de alimentación, se han buscado estrategias dietarias, y una de ellas es retomar el consumo de alimentos tradicionales.

En la actualidad se ha generado evidencia que demuestra que algunas funciones fisiológicas específicas pueden ser moduladas a través de la ingesta de ciertos alimentos como los alimentos funcionales (68). Aunque no existe una definición oficial para los alimentos funcionales, los países involucrados en la investigación de los mismos han llegado a un consenso, por lo que se definen como aquellos alimentos que tiene un efecto benéfico sobre la salud, adicional al aporte nutrimental del mismo. Entre los componentes de los alimentos a los cuales se les ha adjudicado los efectos benéficos, se encuentran la fibra, los ácidos grasos

poliinsaturados y polifenoles. Estos constituyentes pueden actuar en el organismo a través de mecanismos moleculares para regular funciones metabólicas.

La nutrigenómica es una de las herramientas que se utiliza para generar evidencia científica. Ésta ciencia estudia cómo los alimentos pueden regular la expresión de genes (69). Algunos compuestos presentes en los alimentos funcionales pueden regular la expresión de genes a nivel del RNAm, lo cual se debe a las interacciones de los alimentos con los factores de transcripción. Los factores de transcripción son proteínas específicas que interactúan con el DNA, y actúan sobre ciertas regiones silenciadoras o estimuladoras, y/o a través de modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales, que finalmente pueden modificar la expresión génica.

Por lo anterior el consumo de este tipo de alimentos funcionales puede ser utilizado como una estrategia para disminuir algunas patologías relacionadas con procesos metabólicos y/o las complicaciones presentes en las mismas.



## 2 ANTECEDENTES

Se ha demostrado que la modificación de patrones dietéticos establecidos en la población mexicana generan alteraciones metabólicas como lo confirma un estudio realizado con una población Tarahumara de la sierra de Chihuahua. A esta población se le modificó su forma de alimentación habitual por una dieta que contenía alimentos elevados en grasa y carbohidratos durante 5 semanas. Al finalizar, se observa que éste cambio produce un cambio significativo del peso corporal y genera dislipidemia (70). Debido a lo anterior, es de gran importancia retomar el consumo de alimentos tradicionales mexicanos. Una combinación que contenga alimentos como jitomate, nopal, frijol negro, maíz y semillas de chía y de calabaza aportaría diferentes componentes bioactivos como los ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes y fibra soluble e insoluble. Alimentos como la semillas de chía y de calabaza son fuente de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienen gran importancia nutrimental. Se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasa adicionada con diferentes cantidades de semillas de chía (7, 14, 21 y 28%) disminuye los niveles de triglicéridos en plasma (71). Otro estudio demostró que la adición de semilla de chía en la dieta (32%) genera efectos benéficos sobre el metabolismo de lípidos y la homeostasis de la glucosa en un modelo experimental de dislipemia y RI (72). Por otra parte, la adición de una mezcla de semillas en la dieta (33%), que contenía semilla de calabaza, a una dieta alta en colesterol durante 4 semanas disminuye el peso corporal y los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma en un modelo animal (73), sugiriendo el papel hipolipemiante de este alimento.

Los antioxidantes son otros de los compuestos presentes alimentos como jitomate, nopal, frijol negro, maíz y semillas de chía y de calabaza. El nopal tiene en su composición polifenoles como la quercetina, el kaempferol, y la isoramnetina, a los cuales se les ha asociado un papel protector contra el EO. Lo anterior se ha demostrado en diversos estudios. Uno de ellos demostró que en el plasma de pacientes con DT2 hay aumento en la capacidad de neutralizar a las especies reactivas después de haber consumido 300 g de nopal (74). También se ha

demostrado que el consumo de nopal en la dieta (5%) disminuye la cantidad relativa de ER, la concentración de MDA y la acumulación de lípidos en tejido hepático en un modelo de obesidad genética (75); además, se observó esta dieta tiene efecto sobre la abundancia del ARNm de genes como *PPAR- $\alpha$*  y *CPT1* involucrados en la oxidación de ácidos grasos como fuente de energía.

El frijol es otro alimento que contiene antioxidantes como flavonoides, antocianinas y ácidos fenólicos. La presencia de estos compuestos puede asociarse a los efectos del frijol sobre la abundancia del ARNm de genes involucrados en el metabolismo de lípidos. El consumo de compuestos flavonoides extraídos del frijol negro (0.5% en la dieta) disminuye abundancia del ARNm de *SREBP-1c* y *FAS* en un modelo animal (76). Además, la adición de frijol a una dieta alta en grasa, disminuye la cantidad de grasa y el peso corporal e incrementó la sensibilidad a la insulina (77). Otro compuesto antioxidante es el licopeno presente en el jitomate. El consumo de este compuesto (5 mg al día) se asoció a la disminución de marcadores de inflamación como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (78). Además, se ha demostrado que la adición de licopeno (6%) a una dieta alta en grasa promueve la disminución de la resistina y leptina, así como también modula los niveles de adiponectina en un modelo experimental de obesidad (79, 80).

La fibra dietaria es un compuesto al que se le han adjudicado diversos efectos benéficos sobre la salud. Un alimento que contiene fibra soluble e insoluble es el nopal, lo cual se ha asociado al efecto que genera éste sobre la velocidad de absorción de la glucosa, la disminución de la concentración de triglicéridos y de colesterol tanto en circulación como en el tejido hepático (81-84).

Aunque se conocen los efectos benéficos de estos alimentos por separado, no existe evidencia científica que demuestre los posibles efectos benéficos en el consumo de una combinación de alimentos tradicionales sobre diversas patologías presentes en la población mexicana, principalmente la obesidad; así tampoco se han identificado los mecanismos moleculares involucrados en los efectos benéficos que generan el consumo de estos alimentos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

Estudiar el efecto de la combinación de alimentos incluidos en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) sobre el estrés oxidante en el hígado y tejido adiposo en un modelo animal de obesidad, inducido por dieta alta en grasa.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto de diversas dietas sobre el peso corporal, el consumo de alimento y el gasto energético en un modelo de obesidad animal inducido por dieta alta en grasa.
- Evaluar el efecto de la combinación de alimentos incluidos en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) sobre:
  - ❖ Los parámetros bioquímicos como glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, LDL, HDL, adiponectina y leptina.
  - ❖ La abundancia del ARNm de genes involucrados en la lipogénesis (*SREBP-1c*, *ChREB*), oxidación de ácidos grasos (*CPT1*, *PPAR-α*), sistema antioxidante (*Cat*, *GPx*, *GR*, *SOD1* y *SOD2*) e inflamación (*TNF-α* e *IL-6*); así como sobre la abundancia de proteínas involucradas en lipogénesis (*SREBP-1c*, *FAS*) y señalización de la insulina (*P-AKT*, *AKT*) en tejido hepático.
  - ❖ Los marcadores de estrés oxidante (ER, MDA y proteínas oxidadas) y la concentración de glutatión (GSH,GSSG) en hígado.
  - ❖ El estrés oxidante en cerebro y la memoria espacial.
  - ❖ La estructura del tejido adiposo blanco (tamaño de adipocito y cantidad de lípidos).
  - ❖ La abundancia del ARNm de genes involucrados en lipogénesis (*SREBP-1c*, *ChREB*), oxidación de ácidos grasos (*CPT1*, *PPAR-α*) y adipocinas (*leptina*, *adiponectina*) y sobre la abundancia de proteínas involucradas en oxidación de ácidos grasos y termogénesis (*PPAR-α*, *PGC1- α*, *UCP-1* y

Tbx-1); así como también la abundancia de miR-27b y PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo blanco.

- ❖ Las modificaciones en la microbiota, los niveles del péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) y lipopolisacárido (LPS).

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la combinación de alimentos basadas en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) contiene diversos compuestos funcionales, entonces disminuirá algunas anormalidades bioquímicas generadas en la obesidad, al regular la abundancia del ARNm de genes involucrados en la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos, además de disminuir los marcadores de estrés oxidante e inflamación y aumentar la el sistema antioxidante endógeno en tejido hepático y adiposo.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Elaboración y análisis de las dietas

#### 5.1.1 Preparación de las dietas

Uno de los aspectos más importantes en los protocolos de evaluación de modificaciones metabólicas es la composición de las dietas. Para poder controlar lo anterior nosotros elaboramos las dietas. La dieta control que se utilizó se elaboró con las recomendaciones de la American Institute of Nutrition (AIN) para el adecuado desarrollo de los roedores (AIN-93) (85), la DTM se ajustó a la dieta control y la composición de la DAG se basó en estudios anteriores (86) (Tabla 1). Todas las dietas fueron administradas en forma sólida.

Para la selección de los alimentos que componen a la DTM se realizaron algunos análisis previos para poder seleccionar a los diferentes. Basados en las recomendaciones de la AIN-93 se utilizó almidón de maíz (droguería Cosmopolita; catálogo 0228). El jitomate se selecciono la variedad *Saladette* supremo, en el caso del nopal se seleccionó la variedad *Opuntia-ficus indica* ya que ésta es la que se ha asociado a los efectos benéficos en diversos estudios realizados previamente es el departamento de fisiología de la nutrición. El frijol seleccionado fue el frijol negro por el porcentaje de rendimiento que se generó en las pruebas de obtención de la proteína de frijol. Los alimentos mencionados anteriormente fueron adquiridos en la ciudad de México. Después de realizar el análisis del perfil de ácidos grasos de diversas semillas de chía y calabaza se decidió utilizar la semilla de chía y de calabaza adquiridas en el del estado de Morelos y Guerrero, respectivamente. Para poder elaborar la DTM se llevaron a cabo los siguientes procesos:

## **1. Obtención de la proteína de frijol**

Para la obtención de la proteína de frijol se siguió la metodología descrita anteriormente con algunas modificaciones (87) (ANEXO 1). El precipitado que se obtuvo, además de contener proteína presentó compuestos inhibidores de proteasas que tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de los animales, ya que reducen la digestibilidad de la proteína. Entre de estos compuestos se encuentran inhibidores de tripsina, saponinas, hemaglutininas, taninos y factores de flatulencia (88). La mayoría de estos compuestos son termolábiles o solubles en agua; por ello se llevó a cabo un tratamiento térmico en autoclave durante 30 minutos a 121° C (87) y posteriormente se deshidrató la muestra a temperatura constante de 50-60° C durante 16-22 h en un secador atmosférico de charolas (Modelo SSE 17M, Apex) que se encuentra en la planta piloto del Departamento de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ. Posteriormente, la muestras se analizaron en el departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la UNAM para la determinación de la concentración de proteína. El análisis de la concentración de inhibidores de tripsina se realizó en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ. El resultado de la determinación de la concentración de proteína fue de 71 g de proteína en 100 g de muestra; y el valor de antifisiológicos fue 1838 U/g. Este último valor es permisible, ya que se ha reportado que los efectos negativos sobre el crecimiento se presentan con valores mayores a 2000 U/g (89, 90). Los rendimientos que se obtuvieron de la extracción de proteína fueron 10% (10 g de proteína por cada kilogramo de harina de frijol).

## **2. Deshidratación y molienda del jitomate y nopal**

El nopal y jitomate fueron lavados con agua y jabón, y posteriormente se cortaron en trozos de 2 cm de grosor aproximadamente; éstos se colocaron en charolas de metal para poder introducirlos al secador. El jitomate y el nopal fueron deshidratados en un secador atmosférico de charolas (Modelo SSE 17M, Apex)

que se encuentra en la planta piloto del Departamento de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ. Las condiciones que se utilizaron para deshidratar ambos alimentos fueron 16-22 h a una temperatura constante de 55-60° C, para mantener la concentración de compuestos antioxidantes. Posteriormente se llevó a cabo la molienda de ambos alimentos en un molino de rodillos manual. Los productos obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta la elaboración de la DTM.

### **3. Eliminación de cáscara y molienda de la semilla de calabaza**

La cáscara de las semillas de calabaza fue eliminada manualmente, posteriormente las semillas sin cáscara se molieron en un molino de rodillos manual. Los productos obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta la elaboración de la DTM.

Las semillas de chía se adicionaron a la DTM sin ningún proceso previo. Para poder ajustar las cantidades de los alimentos que contenía la DTM se realizaron cálculos basados en la composición química de cada uno de los alimentos (ANEXO 2).



Tabla 1. Composición química de las dietas. Dieta control (AIN-93), dieta alta en grasa (DAG) y la combinación de alimentos basados en una dieta tradicional mexicana (prehispánica) (DTM), compuesta con diferentes alimentos mexicanos como maíz, frijol, nopal, jitomate, semillas de calabaza y de chía. Los datos se expresan como g en 100 g de dieta.

	<b>AIN-93</b>	<b>DAG</b>	<b>DTM</b>
<b>Carbohidratos</b>	62.9	45.95	59.4
Almidón	39.2		
Maltodextrina	13.9		-
Sacarosa	10	10	-
Concentrado de frijol, almidón de maíz, semilla chía y calabaza			59.4
<b>Proteínas</b>			
Caseína	20	24	0
Proteína de la combinación de alimentos	-	-	20
<b>Lípidos</b>			
Aceite de soya	7	7	-
Manteca	-	17	-
Lípidos de semillas de chía y calabaza	-	-	6
<b>Fibra</b>			
Celulosa	5	5	-
Fibra de nopal	-	-	8
Mezcla de minerales	3.5	3.5	3.5
Mezcla de vitaminas	1	1	1
L-Cistina	0.3	0.3	0.3
Colina	0.25	0.25	0.25
TBHQ	0.0014	0.0014	0.0014
<b>TOTAL</b>	100	100	100
<b>Aporte energético (kcal/g)</b>	3.9	5.1	3.8

### 5.1.2 Determinación del perfil de ácidos grasos en las semillas de chía y de calabaza y en las dietas utilizadas en el protocolo

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases.

## **Ensayo**

Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch (91). Posteriormente, los ácidos grasos fueron metilados (derivatizados) con 2 mL de metanol que contenía 0.002% hidroxitolueno butilado, 100 µL de tolueno y 40 µL de ácido sulfúrico disuelto en metanol al 2% (92). Las muestras se incubaron a 90°C durante 2 h, y posteriormente se les añadió 1 mL de NaCl al 5%. Una vez que se obtuvieron los ácidos derivatizados se les añadió 2 mL de hexano. La fase orgánica se evaporó bajo una corriente de nitrógeno hasta sequedad, y el residuo de los ésteres metílicos de ácidos grasos se disolvió en 200 µL de hexano para su análisis por cromatografía de gases (Agilent 6850; Agilent, Santa Clara, CA, USA) con detector de ionización de llama (Agilent), utilizando una columna capilar HP-1 (30-m × 0.32-mm de diámetro interior con 0.25 mm de espesor de la película; J&W Scientific, Albany, CA, USA). La inyección de 1 µL de solución de la muestra se llevó a cabo por duplicado en modo dividido (1:20.8) a 225 °C. Se utilizó helio como fase móvil, con un flujo constante de 0.5 mL/min, y la temperatura de la interfase se mantuvo a 225°C. La temperatura del horno se elevó de 180°C a 200°C (5 min a 180°C, aumentó a 190°C [1°C/min]; 5 min a 190°C, aumentó a 200°C [1°C/min]; 10 min a 200°C). La cuantificación de las muestras se llevó a cabo utilizando estándares de los ácidos mirístico, palmítico, esteárico, palmitoléico, oleico, linoléico, α-linolénico, araquidónico, ácido docosahexaenóico (DHA, por sus siglas en inglés) y ácido eicosapentaenóico (EPA, por sus siglas en inglés). Las áreas de los picos de cada uno de los estándares se obtuvieron de los cromatogramas generados como 100% (93) .

### **5.1.3 Análisis de la composición química de las dietas**

Se realizó el análisis del contenido de fibra total, insoluble y soluble en las diferentes dietas utilizadas en el protocolo mediante el método de la AOAC. Además se identificaron compuestos antioxidantes tales como ácido gálico, catecol, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico, quercetina y kaempferol

mediante HPLC. Ambas metodologías se llevaron a cabo en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM (94, 95).

#### **5.1.4 Determinación de la actividad antioxidante en los alimentos utilizados en el protocolo mediante el método ORAC**

La actividad antioxidante se determinó mediante el método de la capacidad de absorbanza de los radicales libres de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). Este ensayo se basa en la capacidad de atrapamiento del radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ), el cual se genera mediante la reacción entre el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH). El  $\text{ROO}^\bullet$  oxida a la fluoresceína y ésta emite fluorescencia, la cual es monitoreada durante 90 min, tiempo en el que se registran los cambios en la intensidad de la fluorescencia, lo que permite calcular al final del ensayo el área bajo la curva (ABC, por sus siglas en inglés) de la caída de la fluorescencia (96).

#### **Ensayo**

El ensayo se inició con una extracción de los alimentos que componen la DTM, así como también de la dietas utilizadas en el presente protocolo. Se molió 1 g de cada alimento, se adicionaron 4 mL de agua desionizada y se centrifugó a 1000xg durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y al residuo se le agregaron 2 mL de agua desionizada, se centrifugó a 1000xg durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento mencionado anteriormente pero con acetona al 100%. Al finalizar todos los sobrenadantes se mezclaron y se utilizaron para la determinación de la actividad antioxidante mediante ORAC. Para este método se colocó la siguiente mezcla de reacción en una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar) 25  $\mu\text{L}$  de muestra, 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (40 nM) y 25  $\mu\text{L}$  de AAPH (150 mM). Se leyó la cinética durante 90 min en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, Winooski, VA, USA) a longitudes de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

## 5.2 Diseño experimental

### 5.2.1 Animales de experimentación

El modelo experimental utilizado en el presente estudio fueron ratas macho de la cepa Sprague Dawley con peso inicial de 120-150 g obtenidas de HARLAN (n=24). Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones durante todo el estudio: ciclo luz-oscuridad 12h, temperatura constante 21-25° C. Durante el estudio los animales dispusieron de agua y alimento *ad libitum* y se mantuvieron en jaulas individuales (equipo Optirat® Plus, Centennial, Colorado) en el bioterio del INCMNSZ.

Antes de iniciar el protocolo las ratas tuvieron una semana de aclimatación en el bioterio. El protocolo de investigación tuvo una duración de 9 meses y se desarrolló en dos etapas. La primera fue un periodo de inducción de obesidad, la cual tuvo una duración de 6 meses y la segunda etapa fue un periodo de intervención dietaria con una duración de 3 meses (Figura 5).

En la etapa de inducción de obesidad (6 meses) el grupo de inducción de obesidad (grupo DAG+S, n=18) fue alimentado con una dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en el agua (Tabla 1), en esta etapa se tuvo un grupo control (AIN-93, n=6) al cual se alimentó con dieta AIN-93 (Tabla 1). Una vez que se indujo la obesidad en los animales, se comenzó con la segunda etapa de intervención dietaria (3 meses). En esta segunda etapa, el grupo DAG+S (n=18) se subdividió en 3 grupos (n=6 cada grupo) los cuales consumieron una de las siguientes dietas (Tabla 1):

- DAG+S → DAG+S: este grupo siguió consumiendo la DAG+S,
- DAG+S → AIN-93: a este grupo se le cambio la dieta a la control
- DAG+S → DTM: a este grupo se le cambio la DTM.

El grupo control siguió consumiendo la dieta AIN-93 durante esta segunda etapa.

Durante el protocolo se cuantificó el peso corporal de los animales y el consumo de alimento cada 3 días (duración completa de 9 meses).

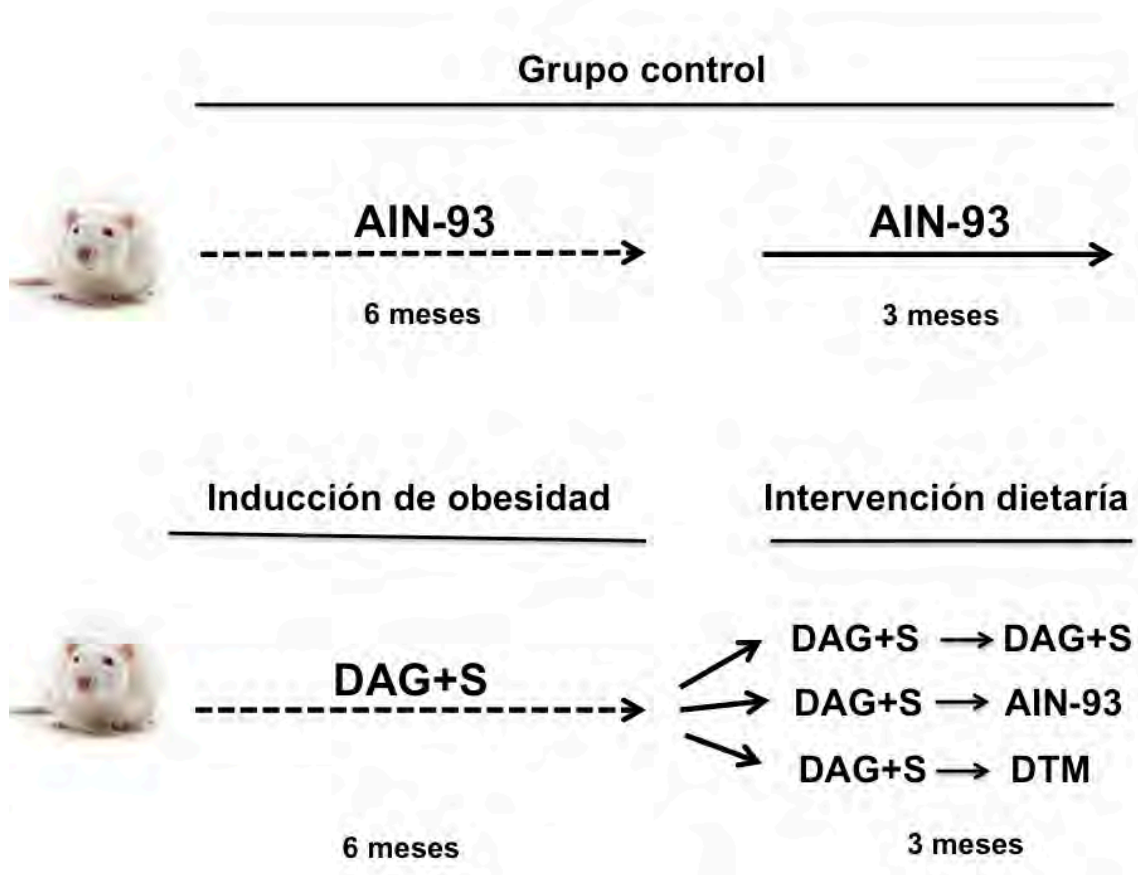


Figura 5. Diseño del protocolo para estudiar el efecto de la DTM sobre de la obesidad. La primera etapa de inducción a obesidad, el grupo de inducción de obesidad (n=18) fue alimentado con dieta alta en grasa saturada + 5% de sacarosa en agua (DAG+S) durante 6 meses. En esta etapa se tuvo un grupo control (n=6) alimentado con dieta control (AIN-93). La segunda etapa de intervención dietaria fue durante 3 meses. El grupo (DAG+S) se subdividió en 3 grupos (n=6), uno de ellos siguió alimentándose con la DAG+S, el segundo modificó a AIN-93 y el tercero se le cambió la dieta a la DTM.

Una vez que concluyeron las dos etapas del protocolo, los animales fueron sacrificados con un ayuno de 8 h. Las ratas primero fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> y posteriormente fueron decapitadas. Se obtuvieron suero y tejidos como: hígado,

tejido adiposo blanco y cerebro. Las muestras fueron almacenadas a -70° C hasta su uso.

### **5.3 Determinación de parámetros bioquímicos y metabólicos en el modelo animal**

#### **5.3.1 Determinación de parámetros bioquímicos en suero**

Algunas modificaciones metabólicas presentes en la obesidad pueden ser identificadas al determinar las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL. Para la determinación de éstas, se utilizaron técnicas espectrofotométricas, las cuales se basan en la generación de un producto visible a cierta longitud de onda. El ensayo que se utilizó para la determinación de la insulina, la leptina y la adiponectina fue la técnica de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Ésta se basa en el uso de un anticuerpo marcado con una enzima. Esta última reaccionará con un sustrato y se producirá un compuesto que podrá ser cuantificado de manera espectrofotométrica (86).

#### **Ensayo**

El suero se obtuvo centrifugando la sangre a 3500xg durante 10 min. Los marcadores bioquímicos como glucosa, triglicéridos, colesterol, LDL y HDL se determinaron en suero con el uso del analizador Cobas 111 (Roche, Basilea, Switzerland) (86). Se utilizaron kits (Alpco Diagnostics) para determinar los niveles de insulina (Catálogo 80-INSRT-E01) , adiponectina (Catálogo 22-ADPRT-E01) y leptina (Catálogo 22-LEPMS-E01).

### **5.3.2 Determinación de la tolerancia a la glucosa mediante una curva de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal**

Una de las determinaciones que permite evaluar la capacidad de metabolizar la glucosa es la prueba de tolerancia de la glucosa. Este ensayo se fundamenta en la administración de una concentración conocida de glucosa seguida de la determinación de la concentración de la misma en circulación.

#### **Ensayo**

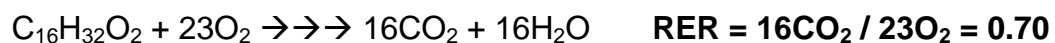
La prueba de tolerancia a la glucosa se llevó a cabo mediante la inyección intraperitoneal de una carga de glucosa de 2 g por kg de peso corporal en las ratas, las cuales tenían un ayuno de 8h. Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena de la cola a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min después de la administración de la carga de glucosa. La concentración de glucosa en plasma se midió usando un medidor de glucosa Ultra OneTouch (LifeScan, Inc., Milpitas, CA) (86).

### **5.3.3 Determinación del gasto energético mediante calorimetría indirecta**

El gasto energético se midió mediante calorimetría indirecta. Esta determinación indica el tipo de sustrato oxidado que es utilizado como fuente de energía, a partir del valor de coeficiente de recambio respiratorio (RER, por sus siglas en inglés). El RER es un valor numérico que se obtiene del cálculo del CO<sub>2</sub> producido/O<sub>2</sub> consumido, dependiendo de sustrato que se esté utilizando como fuente de energía.

En condición de ayuno el valor de RER es 0.7, lo que indica que se están oxidando principalmente lípidos

#### **Lípidos (ácido palmítico)**



y en caso de post-prandio el valor para el RER = 1, este valor que indica la oxidación de carbohidratos.

### **Carbohidratos (glucosa)**



### **Ensayo**

La calorimetría indirecta se llevó a cabo en un Sistema de Monitoreo de animales de laboratorio Oxymax (Columbus Instruments, Columbus OH), con un sistema de flujo abierto conectado al sistema de detección. En este ensayo se mantuvieron a los animales en jaulas individuales durante 48 h. Las primeras 24 h los animales se aclimataron, en un periodo de 12 h en ayuno durante el período de luz y se alimentaron durante el periodo de oscuridad. Se midieron el consumo de O<sub>2</sub> (VO<sup>2</sup> ml/kg/h) y la producción de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>, ml/kg/h) a lo largo de la prueba secuencialmente cada 90 s durante 24 h. Con estos valores se determinó el RER (97).

#### **5.3.4 Análisis histológicos**

Para determinar modificaciones en la morfología de los tejidos y de las estructuras se usan técnicas histológicas. Éstas se utilizan como herramienta diversas tinciones. Las tinciones en los cortes histológicos se basan en el uso de diversos colorantes que son afines a las diversas estructuras celulares. Una de las tinciones más utilizadas es la hematoxilina-eosina (H&E). La hematoxilina (colorante básico) tiñe estructuras ácidas, como el núcleo, en tonos azul y/o púrpura y la eosina (colorante ácido) tiñe componentes básicos como el citoplasma en tonos de color rosa. Se realizaron tinciones de H&E para el tejido hepático y el tejido adiposo visceral.



## **Ensayo**

Un corte transversal del hígado y tejido adiposo se fijó por inmersión en 1 mL de formalina al 10%. Las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina y posteriormente se lavaron 3 veces con parafina fundida a 60° C, se desparafinó con tres lavados de xilol y se rehidrató con tres lavados de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Cuando se enfrió la parafina, el bloque se desmoldó y se procedió a realizar cortes de 4 µm con un microtomo de rotación. Los cortes se colocaron en portaobjetos esmerilados, se fijaron y se tiñeron con H&E (97). Las imágenes se analizaron con el software analizador de imágenes Leica QWIN (Cambridge, UK). El área de los adipocitos se midió con el software de procesamiento de imagen digital, la ImageJ 1.42hp (98).

### **5.3.5 Determinación de la abundancia del ARNm**

La expresión génica se evaluó mediante la extracción de ARN, seguido del método de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés). En la RT se generó ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). El ADNc se utilizó en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), mediante la cual se amplifican segmentos específicos correspondientes a las secuencias de ADN de interés.

### **5.3.6 Extracción del ARN**

El método de extracción de ARN se basa en el uso de fenol-cloroformo e isotiocianato de guanidina. El fenol rompe las células y disuelve sus componentes detergentes, mientras que isotiocianato conserva la integridad del ARN. La adición posterior de cloroformo separa la solución en fase acuosa y orgánica, donde la primera de estas contiene el ARN, el que posteriormente es precipitado con isopropanol.

## **Ensayo**

Se pesaron 500 mg del tejido en un tubo de 1.5 mL, se agregó 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) se siguieron las instrucciones del fabricante (TRI Reagent® Protocol, Producto No. T9424). Al finalizar se calentó a 65° C durante 5 min y se determinó la concentración en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific™). Las muestras se almacenaron -70°C hasta su uso.

### **5.3.7 Generación del ADNc mediante la reacción de transcripción**

La transcripción reversa se denomina así porque se utiliza un molde de ARN para sintetizar una cadena de ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa.

## **Ensayo**

Se preparó una mezcla que contenía el ARN, la enzima transcriptasa reversa y el Oligo dT siguiendo las recomendaciones del fabricante (Catálogo 11756050, Invitrogen).

### **5.3.8 PCR en tiempo real**

La PCR es una técnica desarrollada a mediados de los años 80's. Con esta metodología se pueden producir múltiples copias de un fragmento específico de ADN. Esta técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que produce una cadena de ADNc a otra ya existente. Los requerimientos de esta técnica es que existan nucleótidos en el medio, el ADN que va servir de molde, magnesio (como cofactor de la polimerasa), una enzima Taq polimerasa termoestable, puesto que las temperaturas que se utilizan en esta técnica son elevadas (95°C en las fases de desnaturalización del ADN).

## **Ensayo**

Para el ensayo de PCR en tiempo real se utilizaron dos sistemas de detección, Taqman y SYBR<sup>®</sup> Green. Para PCR con TaqMan se realizó la siguiente mezcla, 10 µL de mezcla maestra, 2 µL de ADNc, 2 µL de sonda Taqman y 2 µL de agua. En caso de SYBR<sup>®</sup>Green la mezcla de reacción fue 10 µL de mezcla maestra, 2 µL de ADNc, 2 µL de una mezcla de oligonucleótidos (sentido/antisentido) y 2 µL de agua (LightCycler<sup>®</sup> Systems, Roche). Las mezclas de reacción se realizaron acorde a las instrucciones del fabricante (LightCycler<sup>®</sup> Systems, Roche). Los oligonucleótidos utilizados y las sondas Taqman se muestran en el ANEXO 3.

### **5.3.9 Extracción de miRNA**

Existen diversos mecanismos de regulación de la expresión génica, uno de ellos es la regulación a partir de miRNA, los cuales son RNA no codificantes que pueden modificar la expresión de algunos genes. Una de las técnicas que se utilizan actualmente para estudiar los cambios en la expresión de miRNA es mediante PCR en tiempo real.

## **Ensayo**

Se realizó la extracción de miRNA del TAB utilizando el Mini kit RNeasy (Catálogo 217004; Qiagen, Hilden, Germany) y se siguieron las instrucciones del fabricante (miRNeasy Mini Handbook). Posteriormente se generó el ADNc usando el kit de miScript II RT (Catálogo 218160; Qiagen, Hilden, Germany). Finalmente se analizó la expresión mediante PCR en tiempo real con SYBR<sup>®</sup> Green Kit miScript PCR (Catálogo 218073; Qiagen, Hilden, Germany) y se siguieron las instrucciones del fabricante (miScript PCR System Handbook). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el ANEXO 3, como miRNA estructural se utilizó RNU6-2.

#### **5.4 Determinación de la abundancia de proteínas en diferentes tejidos mediante Western blot**

Una de las principales estrategias que se utilizan para estudiar las rutas metabólicas es a través de la determinación de proteínas. El Western Blot es una técnica mediante la cual las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana, la cual será incubada posteriormente con anticuerpos. En el Western blot se emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta. En esta técnica se utiliza un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. Posteriormente se utiliza un segundo anticuerpo (secundario), marcado con un enzima, y contra la especie en la que se ha producido el primero. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal detectable y con ello poder observar la proteína de interés.

#### **Ensayo**

La extracción de proteína de hígado y tejido adiposo se realizó utilizando el amortiguador de lisis RIPA, el cual contenía inhibidor de proteasas Complete (Roche Applied Science) con el cual se homogeneizaron los tejidos. Después se incubaron a 4° C durante 40 min, y posteriormente se centrifugaron a 3000xg por 5 min a 4°C. Al finalizar se colectó el sobrenadante (extracto proteico).

Se separaron las proteínas por electroforesis durante 30 min a 75V y 150 min a 100V en un gel de poliacrilamida (7-10%), posteriormente se transfirieron por electrotransferencia (100V por 60 minutos) a una membrana de difluoruro de polivinilo (Amersham, GE Healthcare) y se bloquearon mediante la incubación con leche descremada al 5% en TBS 1X y 0.1% Tween. Las membranas se incubaron toda la noche a 4° C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: proteína de unión al elemento regulador del estero1 1c (SREBP-1c, por sus siglas en inglés) dilución 1:2000, sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés) dilución 1:2000, proteína cinasa B (AKT, por sus siglas en inglés) dilución 1:500 y AKT fosforilado dilución 1:500, la proteína T-box 1 (Tbx-1, por sus siglas en inglés)

dilución 1:2000, receptores activados de proliferación de los peroxisomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) dilución 1:1000, receptores activados de proliferación de los peroxisomas  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ , por sus siglas en inglés) dilución 1:1000 (Santa Cruz, CA, USA). Así como también la proteína desacoplante 1 (UPC-1, por sus siglas en inglés) dilución 1:3000, coactivador de receptores activados de proliferación de los peroxisomas  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) dilución 1:1000 y malondialdehído (MDA) dilución 1:1500 (ABCam, MA, USA). Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS 1X y 0.1% Tween y finalmente las membranas se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos secundarios anti-conejo IgG-HRP y anti-cabra IgG-HRP durante 90 min. Se utilizó  $\gamma$ -tubulina (dilución 1:1000) como proteínas estructural para normalizar los datos. La quimioluminiscencia emitida se determinó usando reactivos de detección Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) y el sistema ChemiDoc MP Imaging (BioRad) (99).

### **5.5 Extracción de triglicéridos y colesterol en tejido hepático y adiposo**

Los lípidos del hígado y TAB se extrajeron como se ha descrito previamente por Folch (91). El colesterol (Colesterol FS\*) y los triglicéridos (Triglicéridos FS\*) se midieron con un kit colorimétrico enzimático comercial (Diagnostic Systems DiaSys, Holzheim, Alemania). El producto final se determinó a una longitud de onda de 547 nm en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, Winooski, VA, USA).

### **5.6 Determinación de marcadores de estrés oxidante**

Dentro de las modificaciones que se generan por el aumento de las ER son la oxidación de diversas moléculas como son los lípidos y las proteínas. Los cuales pueden ser evaluados como marcadores de EO.

Para llevar a cabo la determinación de estos marcadores de EO se realizó un homogeneizado de los tejidos. Se pesaron 50 mg del tejido y se disolvieron en 500

µL de amortiguador que se requirió en cada ensayo; esta mezcla se homogeneizó con un homogeneizador manual (pellet pestles-Cordless motor, Sigma-Aldrich) durante 30 seg, se centrifugó a 3500xg durante 15 min y se obtuvo el sobrenadante. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso.

### **5.6.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno en tejido hepático**

Una de las técnicas para la detección intracelular de ER, es mediante el uso diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (DCD-FDA). Esta molécula fluoresce hasta que se eliminan los grupos acetato por las esterasas intracelulares y se oxida por ER que estén dentro de la célula. Por lo tanto, el uso de esta sonda sirve como indicador del estado redox en general en las células o en un tejido.

#### **Ensayo**

La formación de ER se estimó por un método fluorométrico (100). En una placa negra de 96 pozos (marca Corning Costar) se colocó la siguiente mezcla de reacción 300 µL del homogeneizado, 100 µL de DCD-FDA (5 mM), se incubó a 37°C durante 60 min. La intensidad de fluorescencia se registró al final de la incubación en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, Winooski, VA, EE.UU.) a las longitudes de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm (100).

### **5.6.2 Determinación de lipoperoxidación mediante la cuantificación del malondialdehído**

Uno de los procesos de oxidación de los ácidos grasos se denomina lipoperoxidación. Se trata de una reacción en cadena o auto-catalítica, es decir que, una vez que se inicia, continúa desarrollándose por sí misma. Uno de los productos finales de la lipoperoxidación es el malondialdehído (MDA), el cual es considerado como marcador de EO. El MDA se puede determinar de manera espectrofotométrica, ya que este compuesto forma un complejo colorido con el 1-metil-2 fenilindol (1M2F) el cual se cuantifica a 586 nm (Figura 6) (101).

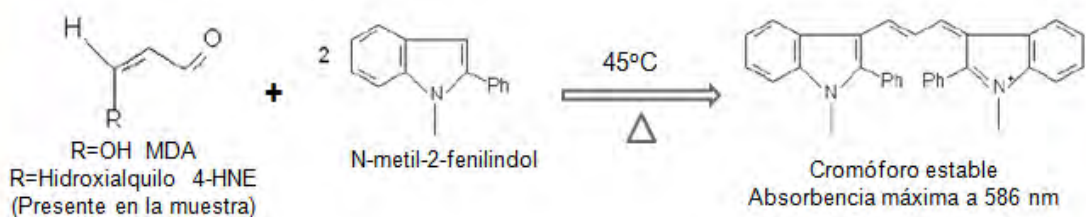


Figura 6. Reacción entre el malondialdehído (MDA) y el 1-metil 2-fenilindol (1M2F). La reacción entre el MDA y el 1M2F genera un cromóforo estable que se puede determinar de manera espectrofotométrica a 586 nm.

### Ensayo

En tubos de ensayo o en tubos eppendorf de 1.5 mL se hicieron diversas mezclas como se especifica en la tabla 2.

Tabla 2. Mezcla para determinación de MDA en estándares y muestras.

	Blanco	Tubo estándares	Tubo muestra	Blanco de muestra
A. fosfato 50 mM pH 7.4	0.2 mL	--	--	--
Estándares de MDA	--	0.2 mL	--	--
Muestra (1 mg de proteína)	--	--	0.2 mL	<b>0.2 mL</b>
Sol. de 1M2F (acetonitrilo:metanol; 3:1)	0.65 mL	0.65 mL	0.65 mL	--
HCl concentrado	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	<b>0.15 mL</b>
Sol. acetonitrilo:metanol (3:1)	--	--	--	<b>0.65 mL</b>

Las reacciones se mezclaron e incubaron a 45°C durante 40 min, posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 3000x g durante 5 min. Y finalmente se determinó la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro DU 640 Beckman Coulter.

### 5.6.3 Determinación de proteínas oxidadas

Las proteínas oxidadas se determinaron mediante un método espectrofotométrico. El ensayo se basa en la reacción del grupo carbonilo con la dinitrofenilhidrazina (DNPH, por sus siglas en inglés) formando un complejo colorido (Figura 7) (102).

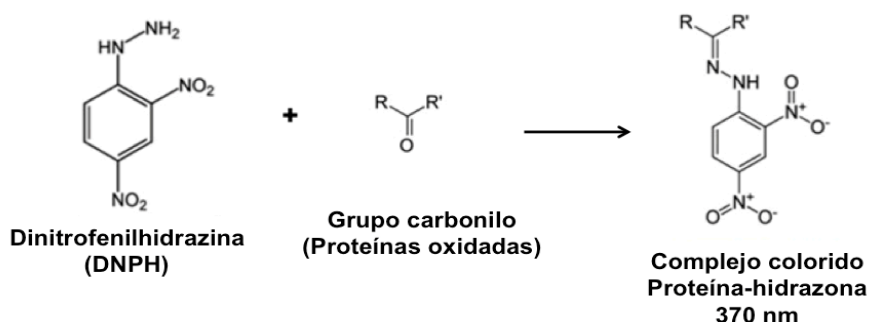


Figura 7. Reacción entre el dinitrofenilhidrazina (DNPH) y el grupo carbonilo formado por la oxidación de las proteínas. El producto es complejo colorido que se puede determinar de manera espectrofotométrica a 370 nm.

### Ensayo

Para este ensayo se utilizaron 300  $\mu$ L homogeneizados de hígado, los cuales se incubaron durante la noche con 100  $\mu$ L de sulfato de estreptomicina (10%, p/v) para eliminar los ácidos nucleicos. Posteriormente, se centrifugaron durante 40 min a 14000xg y se recuperó el sobrenadante. Éste se dividió en dos, a 150  $\mu$ L se le añadieron 600  $\mu$ L de DNPH (10 mM) y a los otros 150  $\mu$ L se le añadieron 600  $\mu$ L de HCl (2.5 M), ambas mezclas se incubaron durante 1 h en la oscuridad, a temperatura ambiente. Después se agregaron 150  $\mu$ L de ácido tricloroacético (20%, v/v) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 xg durante 10 min. El paso anterior se repitió una vez más pero con la adición de ácido tricloroacético (10%, v/v). Los sedimentos se lavaron tres veces con 600  $\mu$ L de acetato de etilo/etanol (1:1 v/v). Las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 10 min, finalmente los sedimentos se suspendieron con 1 mL de 6 M clorhidrato de guanidina y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 370 nm en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT



(Biotek, Winooski, VA, EE.UU.). El contenido de proteínas oxidadas se expresó como proteína carbonilada nmol/mg de proteína (102).

#### 5.6.4 Determinación de las concentraciones de glutatión

Los niveles de GSH y GSSG se midieron usando un método espectrofotométrico. Este ensayo se basa en la reacción de GSH con reactivo de sulfhidrilo 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar un derivado amarillo, 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) que se puede medir a 412 nm (Figura 8) (103).

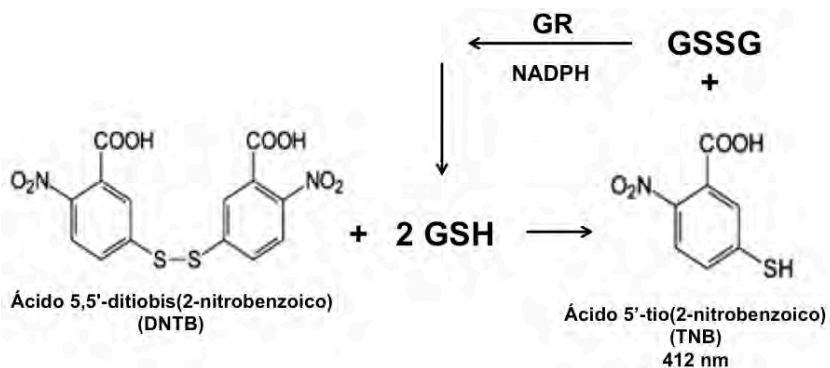


Figura 8. Reacción entre el ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) y el glutatión (GSH). El producto es se puede determinar de manera espectrofotométrica a 412 nm. La determinación de GSSG es de manera indirecta a través de la reacción enzimática con la glutatión reductasa (GR).

#### Ensayo

Se determinó la concentración de GSH y GSSG en un homogeneizado de hígado. El homogeneizado se realizó en 0.5 mL de ácido metafosfórico al 0.5%. Para llevar a cabo el ensayo se colocaron 20 µL de homogeneizado de hígado (diluído 1:2 en un amortiguador que contenía 0.1 M de fosfato de potasio, 5 mM ácido etilendiaminotetraacético disódico, pH 7.5), y se le añadió 120 µL de una solución recién preparada de DTNB (2.5 mM) y glutatión reductasa (250 U/mL) y se mezcló durante 30 s. Posteriormente, se agregaron 60 µL de NADPH y se midió la absorbancia a 412 nm inmediatamente, con intervalos de 30 segundos durante 2

minutos en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, Winooski, VA, EE.UU.). Para la determinación de GSSG se siguió la metodología mencionada anteriormente, pero las muestras tuvieron un tratamiento previo con 2  $\mu$ L de 2-vinilpiridina obtener GSH. Los niveles de GSH y GSSG se expresan como nmol / mg de proteína (103).

### **5.7 Evaluación de la memoria espacial**

Existen diferentes métodos para evaluar la memoria en animales. Uno de éstos es la prueba de laberinto T. Está permite analizar el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo, ya que evaluar el tiempo de latencia que emplea el animal para alternar entre la izquierda-derecha, lo que hace referencia a la memoria en los roedores (104).

#### **Ensayo**

El ensayo se llevó a cabo en en dos fases: una fase de muestra y una fase de sondeo. La sesión de entrenamiento (fase de muestra) consistió en colocar a los animales en el brazo de partida, lo que les permite elegir entre uno de los dos brazos objetivas. La fase de sondeo es el tiempo de latencia que tardan los animales en entrar en cada brazo, así como la alternancia. Se registraron los datos obtenidos en cinco sesiones para cada animal.

### **5.8 Determinación de la modificación de la microbiota intestinal y niveles de GIP y LPS**

Existe una relación entre las modificaciones en la microbiota y diversas alteraciones metabólicas. Una de las técnicas que se utiliza para determinar estos cambios en las diferentes especies de bacterias es mediante el uso de PCR, así como también la determinación de moléculas que tienen un papel importante en el adecuado funcionamiento del intestino como el GIP y LPS determinados mediante el ensayo ELISA.

### **5.8.1 Extracción de DNA de heces**

Al finalizar el protocolo se recolectaron heces de los animales para determinar los cambios en la composición de la microbiota mediante PCR. Para la identificación de los phyla se utilizó la secuencia del gen 16S ribosomal, que sirve para comparación de secuencias presentes en las bacterias con zonas conservadas, variables e hipervariables, y permiten establecer relaciones filogenéticas.

#### **Ensayo**

La extracción de DNA en heces se realizó mediante el uso de un kit de extracción de DNA de heces (Catálogo 51504; Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAamp® DNA Stool Handbook). El análisis de la abundancia de bacterias se realizó mediante PCR en tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos para cada tipo de bacteria (ANEXO 3) y como estructural se utilizó el oligonucleótido universal (105).

### **5.8.2 Determinación de los niveles de GIP y LPS**

Los niveles del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Raybiotech, Inc., Catálogo EIAR-GIP-1) y lipopolisacárido (LPS) (Cloud-Clone Corp., Catálogo CEB526Ge) se determinaron mediante kits.

## **6. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron en promedio  $\pm$  EEM. Los datos fueron analizados mediante una *t de Student* de muestras independientes y un análisis de varianzas (ANOVA de una vía) seguido de una prueba de comparaciones múltiples Banferroni. Para esto se empleó el software Prims 5.0 (GraphPad, EE.UU). Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Las diferencias entre todos los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis de la composición química, actividad antioxidante, compuestos antioxidantes y perfil de lípidos en la dietas y en los componentes de la DTM

Los antioxidantes que provienen de la dieta tienen un papel muy importante, ya que ayudan a equilibrar el exceso de ER, además de que algunos de los ellos pueden inducir la expresión del sistema antioxidante endógeno. Considerando que la DTM contiene alimentos que se han asociado a la presencia de antioxidantes, se evaluó esta actividad mediante el ensayo ORAC. Los resultados mostraron que los componentes de la DTM presenta actividad antioxidante, siendo el nopal el alimento que tuvo la actividad más alta ( $8737 \pm 1.03$  equivalentes Trolox ( $\mu\text{moles/g}$ )) (Figura 9 A). Por otro lado, la actividad antioxidante de la DTM fue diez veces mayor que la dieta control (AIN-93) y la DAG ( $p < 0.001$ ) (Figura 9 B). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM ( $n = 5$ ). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni (GraphPad, EE.UU.). Todas las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

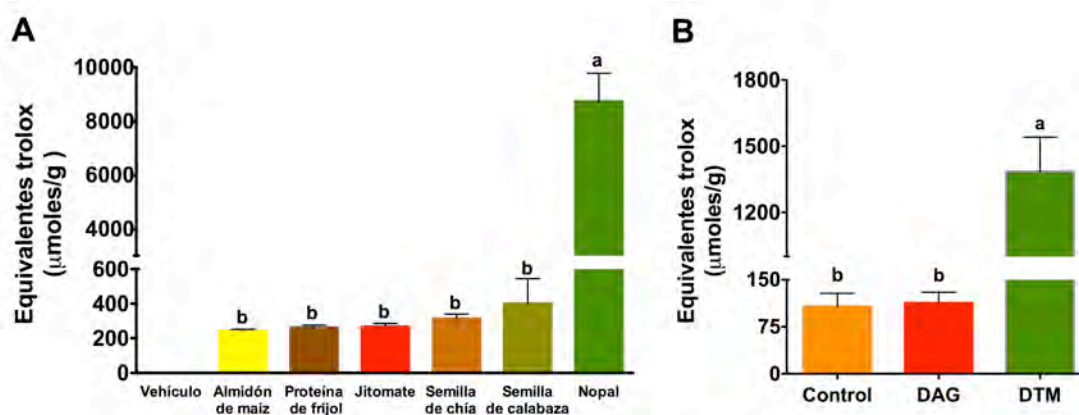


Figura 9. Actividad antioxidante del almidón de maíz, proteína de frijol, jitomate, nopal y las semillas de chíá y de calabaza (A). Actividad antioxidante de las diferentes dietas utilizadas en el protocolo: dieta control (AIN-93), DAG y DTM (B). Los datos se muestran como equivalentes de Trolox (micromoles/g de muestra).

Con base en los resultados anteriores, se decidió identificar los posibles compuestos que confieren la antioxidante en las dietas. Como era de esperarse, sólo la DTM presentó antioxidantes como catecol, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico, quercetina y kaempferol (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de compuestos antioxidantes en las dietas usadas en el protocolo. Los datos se expresan en mg/100 g de dieta. Promedio  $\pm$  EEM (n = 3).

	<b>AIN-93</b>	<b>DAG</b>	<b>DTM</b>
<b>Compuesto</b>			
<b>Ácido gálico</b>	ND	ND	ND
<b>Catecol</b>	ND	ND	0.4033
<b>Ácido cafeico</b>	ND	ND	ND
<b>Ácido clorogénico</b>	ND	ND	0.1089
<b>Ácido cumárico</b>	ND	ND	ND
<b>Quercetina</b>	ND	ND	0.2699
<b>Kaempferol</b>	ND	UD	0.2528

ND: no detectado.

De igual modo, se analizó el perfil de los ácidos grasos de cada una de la dietas utilizadas en el protocolo. Uno de los principales hallazgos en este análisis fue la presencia de pequeñas cantidades de ácido docosahexaenóico (DHA, 20:6) y ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5) en la semilla de calabaza, esto es debido a que la presencia de estos compuestos principalmente se han identificado en productos animales de origen marino. Otros ácidos grasos identificados en ésta semilla fueron ácido oleico (18:1), ácido palmítico y ácido esteárico (Tabla 4). En la semilla de chía se identificaron principalmente  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3) y ácido

linoléico (18:2), así como pequeñas cantidades de ácido oleico (18:1), ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0) (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de ácidos grasos en las semillas de chía y de calabaza. Los datos se reportan como µg/100 mg de alimento. Promedio ± EEM (n = 3).

	Semilla de chía	Semilla de calabaza
<b>Ácido graso</b>		
<b>Ácido palmítico (16:0)</b>	1600 ± 12	11883 ± 76
<b>Ácido esteárico (18:0)</b>	971 ± 3	5707 ± 2
<b>Ácido oleico (18:1)</b>	1495 ± 6	21591 ± 90
<b>Ácido linoléico (18:2)</b>	2845 ± 12	ND
<b>Ácido α-linolénico (18:3)</b>	7570 ± 30	ND
<b>EPA (20:5)</b>	ND	968 ± 289
<b>DHA (20:6)</b>	ND	1334 ± 24

DHA, ácido docosahexaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico. ND: No Detectado

Respecto a los ácidos grasos identificados en las dietas, se observó que la DTM contenía menor cantidad los ácidos grasos en general, así como también una relación adecuada omega-6/omega-3 (2:1) en comparación con la dieta AIN-93 (6:1) y la DAG (8:1) (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de ácidos grasos en las dietas utilizadas en el protocolo. Los datos se reportan como  $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  de alimento. Promedio  $\pm$  EEM (n=4).

Ácido graso	AIN-93	DAG	DTM
Ácido mirístico (14:0)	18 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	264 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	15.4 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Ácido palmítico (16:0)	227 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>	146 $\pm$ 24 <sup>c</sup>	312 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>
Ácido esteárico (18:0)	104 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 10.6 <sup>a</sup>	57.4 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
Ácido palmitoléico (16:1)	65 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	104 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
Ácido oleico (18:1)	283 $\pm$ 14.2 <sup>b</sup>	625 $\pm$ 74.5 <sup>a</sup>	233 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>
Ácido linoléico (18:2)	625 $\pm$ 25.2 <sup>b</sup>	851 $\pm$ 37 <sup>a</sup>	242 $\pm$ 13.3 <sup>c</sup>
Ácido $\alpha$ -linolénico (18:3)	66 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	109 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	105 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>
Ácido araquidónico (20:4)	Trazas	0	Trazas
EPA (20:5)	7.6 $\pm$ 0.2	0	Trazas
DHA (22:6)	24.8 $\pm$ 0.7	0	Trazas
Relación $\omega$ -6/ $\omega$ -3	6:1	8:2	2:1

DHA, ácido docosahexaenólico; EPA, ácido eicosapentaenólico.

La fibra dietaria es un componente que es de gran importancia en la nutrición, por lo cual se llevó a cabo el análisis del contenido de fibra total, soluble e insoluble en las diferentes dietas. Se observó que la DTM contiene una mayor cantidad de fibra total de la cual contiene 2% de soluble y 6.1% de insoluble, lo cual es mayor a la cantidad de fibra que contienen las otras dietas, la dieta AIN-93 contenía 4.8% de fibra insoluble, sin presentar soluble, mientras que la DAG tenía 4.8% de fibra insoluble y 0.2% de fibra soluble (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de la fibra en la dietas utilizadas en el protocolo. Los datos se expresan en g/100 g de dieta. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n = 3).

	AIN-93	DAG	DTM
<b>Fibra total</b>	4.8	5	8.1
<b>Fibra soluble</b>	-	4.8	2
<b>Fibra insoluble</b>	4.8	0.2	6.1

## 7.2 El consumo de la DTM disminuyó la ganancia de peso corporal y las alteraciones bioquímicas producidas por la obesidad

Al finalizar el protocolo, como era de esperarse el consumo de la DAG+S (DAG+S  $\rightarrow$  DAG+S) incrementó el peso corporal significativamente en un 13.7% respecto al grupo AIN-93  $\rightarrow$  AIN-93 (control) ( $p < 0.001$ ) (Tabla 7). Este incremento de peso corporal en el grupo DAG+S se asoció directamente con el aumento de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y LDL comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ) (Tabla 7).

No obstante, después de la intervención dietaria con la DTM durante 3 meses, hubo una disminución significativa en el peso corporal ( $p < 0.05$ ) así como de todos los parámetros bioquímicos en comparación con las ratas que consumieron la DAG+S durante todo el protocolo (Tabla 7). El grupo DAG+S  $\rightarrow$  AIN-93 (AIN-93) no presentó diferencias significativas en la ganancia de peso corporal comparado con el grupo DAG+S después de 3 meses de intervención dietaria (Tabla 7). Además de estas regularizaciones metabólicas, la intervención dietaria con la DTM redujo significativamente las concentraciones de insulina y leptina, además de generar un aumento de la concentración de la adiponectina, en comparación con el grupo DAG+S (Tabla 7).



Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n= 5). Los datos de la primera etapa se analizaron mediante una prueba *t Student* de muestras independientes vs grupo de control y se consideraron diferencias estadísticamente significativas a \*p <0.05 y \*\*p<0.01. En la segunda etapa, el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de p <0.05. Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde a> b> c.

Tabla 7. Efecto de una dieta alta en grasa + 5% de sacarosa en agua durante 6 meses (inducción a obesidad) y la intervención dietaria con diferentes tipos de dieta durante 3 meses sobre el peso corporal, consumo de alimento, parámetros de bioquímicos y contenido de lípidos en el hígado

Parámetros	Inducción de obesidad		Intervención dietaria			
	AIN-93	DAG+S	AIN 93→ AIN-93	DAG+S→ DAG+S	DAG+S+S→ AIN-93	DAG+S→ DTM
<b>Peso (g)</b>	467 $\pm$ 9.7	538.4 $\pm$ 9.7**	477 $\pm$ 13.4 <sup>c</sup>	574.3 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>	560.8 $\pm$ 17.2 <sup>a</sup>	500.5 $\pm$ 12.8 <sup>b</sup>
<b>Consumo de alimento (Kcal/día)</b>	58.7 $\pm$ 3.4	71.4 $\pm$ 1.9*	67.7 $\pm$ 3.35	78.5 $\pm$ 12.2	72.3 $\pm$ 2.49	70.4 $\pm$ 5.29
<b>Suero</b>						
<b>Insulina (ng/mL)</b>	0.98 $\pm$ 0.1	2.86 $\pm$ 0.2**	0.99 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.43 $\pm$ 0.216 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.64 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
<b>Glucosa (mg/mL)</b>	108 $\pm$ 1.05	116 $\pm$ 0.98**	112 $\pm$ 4.43 <sup>a,b</sup>	124 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	103 $\pm$ 5.43 <sup>a,b</sup>	90.6 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
<b>Triglicéridos (mg/mL)</b>	112 $\pm$ 9.71	173 $\pm$ 10.8**	109 $\pm$ 19.8 <sup>b</sup>	151 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 15.9 <sup>a,b</sup>	92.9 $\pm$ 12.2 <sup>c</sup>
<b>Colesterol (mg/mL)</b>	106 $\pm$ 7.89	135 $\pm$ 4.33**	104.1 $\pm$ 4.26 <sup>b</sup>	137.3 $\pm$ 9.24 <sup>a</sup>	112.6 $\pm$ 2.98 <sup>b</sup>	106 $\pm$ 5.03 <sup>b</sup>
<b>LDL (mg/mL)</b>	19.3 $\pm$ 1.82	25.5 $\pm$ 1.61*	25.9 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>	33.5 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	27.6 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	28.4 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
<b>HDL (mg/mL)</b>	83.9 $\pm$ 5.23	93.9 $\pm$ 3.45	71.5 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	94.2 $\pm$ 6.72 <sup>a</sup>	77.4 $\pm$ 2.74 <sup>b</sup>	80.4 $\pm$ 4.60 <sup>b</sup>
<b>Adiponectina (<math>\mu</math>g/mL)</b>	-	-	16.5 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	13.3 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>	16.7 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>
<b>Leptina (ng/mL)</b>	-	-	2.7 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	6.7 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>
<b>Hígado</b>						
<b>Triglicéridos (mg/g de tejido)</b>	-	-	9.22 $\pm$ 0.33 <sup>b,c</sup>	11.1 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	9.83 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	7.73 $\pm$ 0.34 <sup>c</sup>
<b>Colesterol (mg/g de tejido)</b>	-	-	3.63 $\pm$ 0.06	4.03 $\pm$ 0.05	3.57 $\pm$ 0.04	3.47 $\pm$ 0.06

### 7.3 La DTM disminuyó la intolerancia a la glucosa e incrementó el gasto energético en un modelo de obesidad

Una de las repercusiones de la obesidad es la alteración del metabolismo de carbohidratos, lo cual se pudo confirmar con los resultados obtenidos para el grupo que consumió durante 9 meses la DAG+S, ya que presentó el valor más elevado del área bajo la curva (ABC) en la curva de tolerancia a la glucosa (Figura 10 A,B). De manera muy interesante se observó que el consumo de la DTM durante 3 meses produjo una disminución significativa del valor del ABC, incluso menor a la del grupo control ( $p < 0.01$ , Figura 10 A,B). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM ( $n = 5$ ). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativos con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

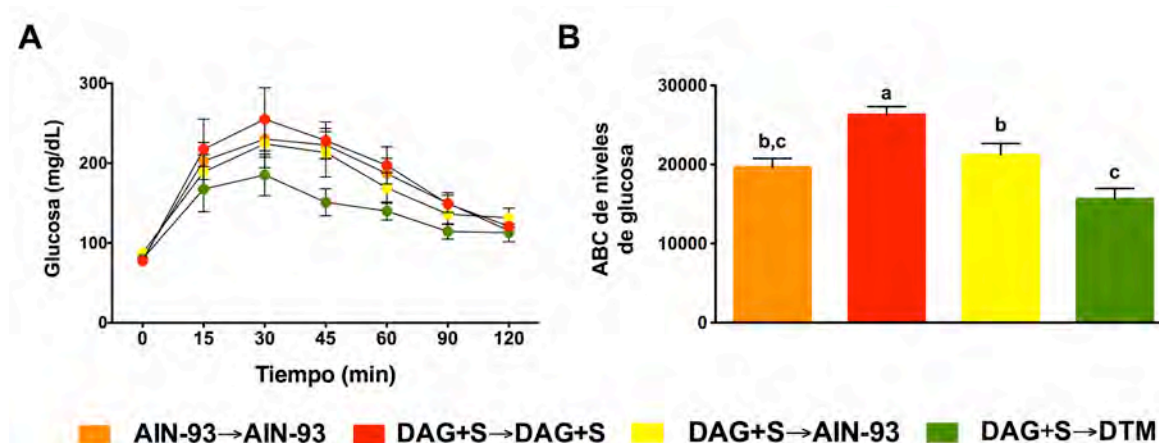


Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa realizada al finalizar la intervención dietaria. Prueba de tolerancia a la glucosa (A) y valores del área bajo la curva (B) después del consumo de diferentes tipos de dietas.

La mejora metabólica observada en la curva de tolerancia a la glucosa de las ratas obesas que consumieron DTM durante 3 meses se acompañó de un aumento en el gasto energético determinado mediante una calorimetría indirecta. Los

resultados muestran que el grupo DTM presentó un aumento en el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), cuyos valores fueron similares a los observados en el grupo de control (Figura 11D). Por otra parte, el grupo que consumió DAG+S durante 9 meses generó una disminución significativa en el valor de RER ( $0.85 \pm 0.003$ ) en post-prandio, el cual fue muy similar a lo observado en ayuno, lo que sugiere que no hubo cambio en la oxidación de sustrato en comparación con el grupo control ( $0.90 \pm 0.002$ ) (Figura 11 A, B). En consecuencia del consumo de la DTM durante 3 meses, el valor de RER se incrementó significativamente ( $0.91 \pm 0.002$ ) en post-prandio (noche) en comparación con el grupo DAG+S, lo que sugiere que el consumo de la DTM promueve el uso adecuado de sustratos dependiendo del estado metabólico (Figura 11 C, D). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM ( $n = 5$ ). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativos con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

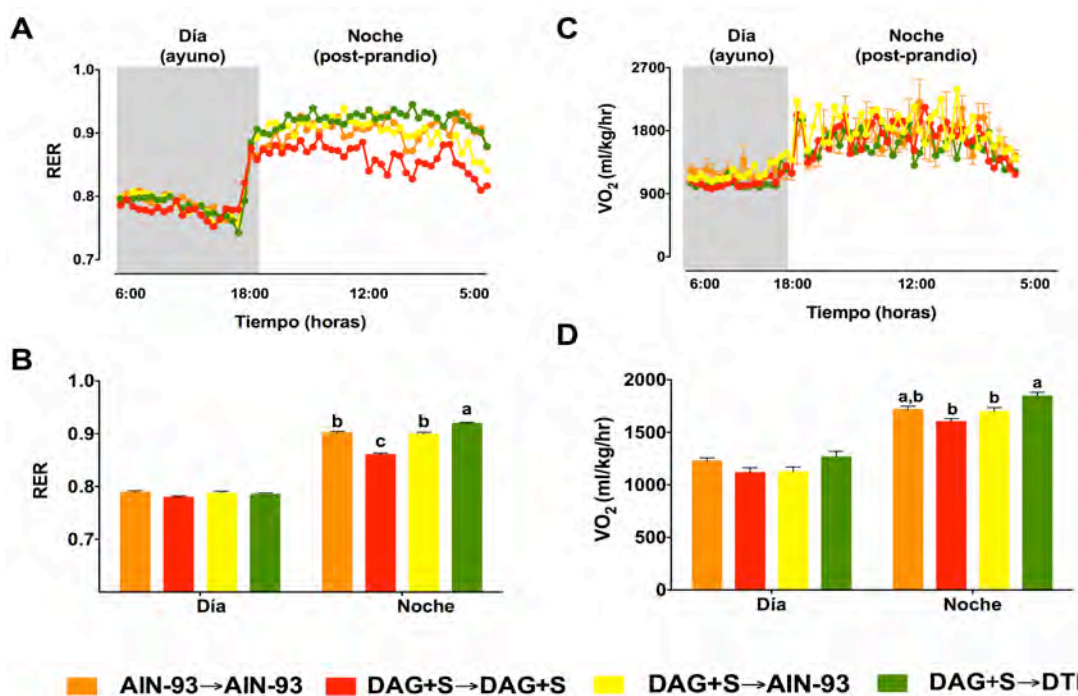


Figura 11. Determinación de gasto energético mediante calorimetría indirecta. RER y promedio del valor del RER después del consumo de diferentes tipos de dietas (A,B). Consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y promedio del  $VO_2$  después del consumo de diferentes tipos de dietas (C,D).

## **7.4 Modificaciones en el tejido hepático debido al consumo de la DTM**

### **7.4.1 El consumo de la DTM redujo el daño hepático y moduló la abundancia de ARNm de genes involucrados en lipogénesis, de enzimas antioxidantes e inflamación en tejido hepático**

El consumo de dietas altas en carbohidratos y lípidos está relacionado con la excesiva acumulación de lípidos en diversos tejidos, uno de los tejidos más susceptible a este proceso es el hígado. Debido a ello se analizó este tejido en los diferentes grupos. Como era de esperarse, el consumo de la DAG+S incrementó la concentración tanto de triglicéridos como colesterol en el hígado (Tabla 7); lo anterior se asoció directamente con el aumento en la acumulación de lípidos que se observó como micro-vesículas lipídicas en las histologías del tejido hepático (Figura 12 A). Sin embargo, la intervención dietaria con la DTM disminuyó significativamente la concentración de triglicéridos y colesterol hepáticos (Tabla 7), así como también atenuó la acumulación de lípidos en este tejido, siendo muy similar a lo que se observó en el grupo control (Figura 12 A).

A su vez, se analizó la abundancia relativa de ARNm de varios genes en este mismo tejido. En el grupo DAG+S se aumentó el ARNm de genes implicados en la lipogénesis como *SREBP-1c*, *ChREBP* y *FAS* (Figura 12 B), lo cual fue acompañado de una disminución del ARNm de genes relacionados con la oxidación grasos como *PPAR- $\alpha$*  (Figura 12 B); además se observó que aumentó del ARNm de genes responsables de la inflamación (*IL-6* y *TNF- $\alpha$* ) (Figura 12 B). Sin embargo, después de la intervención dietaria con la DTM y la dieta AIN-93 se produjo una disminución significativa de los niveles del ARNm de genes involucrados en lipogénesis y en inflamación (Figura 12 B).

#### **7.4.2 La DTM modificó la abundancia de proteínas involucradas en lipogénesis y señalización de insulina en el hígado**

Adicionalmente, se evaluaron los cambios en abundancia de varias proteínas en el hígado. En los resultados se observó el grupo DAG+S indujo un incremento en SREBP1-c y FAS en este tejido (Figura 12 C). De manera contraria a lo resultados observado en los grupos AIN-93 y DTM, en cuyos tratamientos se disminuyeron ambas proteínas (Figura 12 C).

Por otra parte, la vía de la PI3K es el principal mecanismo por el cual la insulina ejerce sus funciones. Para evaluar esta vía se analizó la abundancia de proteínas involucradas en este proceso, como la activación de la proteína cinasa B (AKT) mediante fosforilación en residuos de serina 473 (Ser 473). En los resultados se observó que en el grupo DTM se incrementó la fosforilación de AKT en comparación con el grupo DAG+S (Figura 12 C). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM ( $n = 5$ ). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

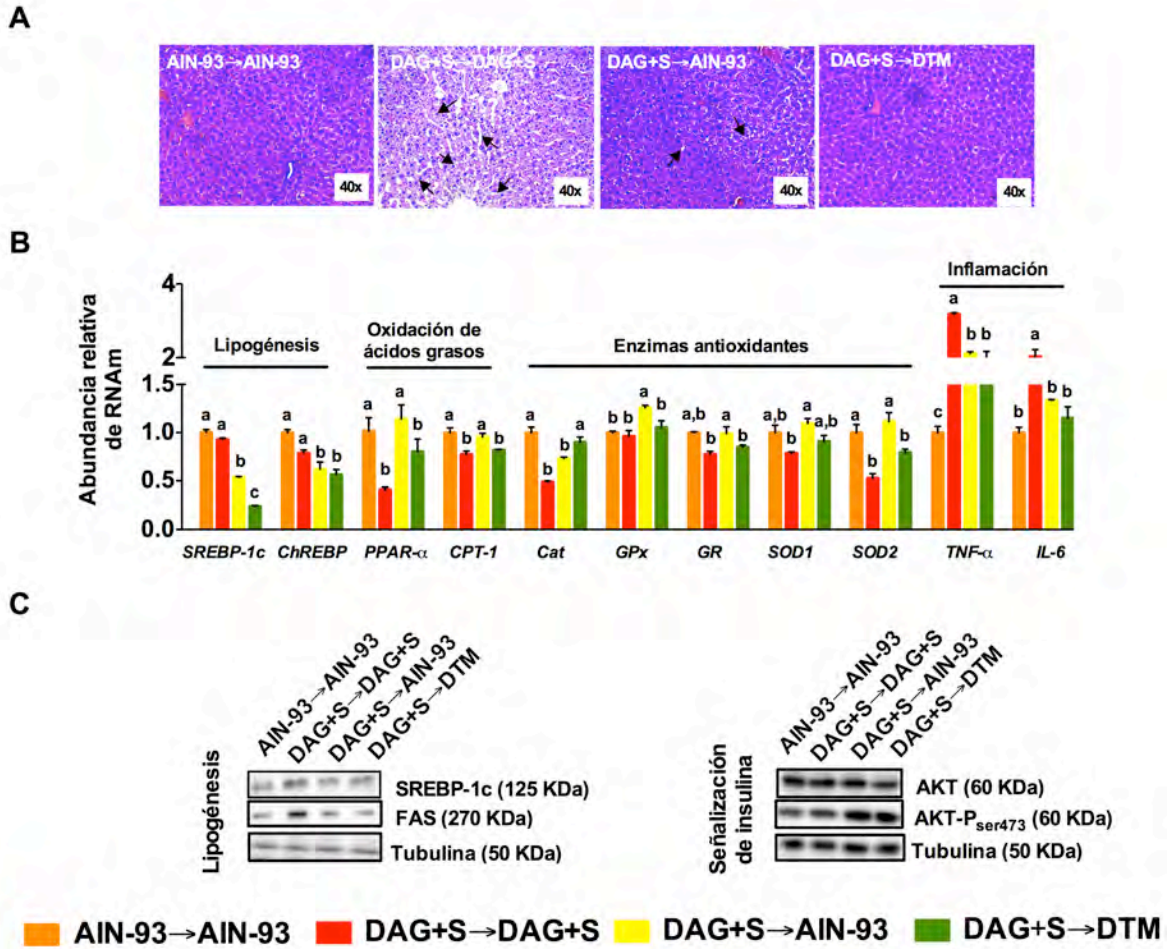


Figura 12. Modificaciones generadas en el tejido hepático por el consumo de la DTM. **A)** Análisis de la morfología del tejido hepático mediante técnicas histológicas y tinción H&E de los grupos control, DAG+S, AIN-93 y DTM. **B)** Determinación mediante PCR en tiempo real de la abundancia relativa de ARNm de genes involucrados en:  $\beta$ -oxidación como factor de transcripción factor proliferación peroxisomal alfa (*PPAR- $\alpha$* ) y carnitina palmitoil transferasa 1 (*CPT-1*); lipogénesis como proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides 1c (*SREBP-1c*) y proteína de unión a los elementos de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*); expresión de enzimas antioxidantes como catalasa (*Cat*), glutatión peroxidasa (*GPx*), Glutatión reductasa (*GR*), superóxido dismutasa 1 (*SOD1*) y superóxido dismutasa 2 (*SOD2*); inflamación como el factor de transcripción factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ) y la interleucina 6 (*IL-6*). **C)** Determinación mediante western blot de la abundancia de proteínas mediante involucradas en lipogénesis: proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides 1c (*SREBP-1c*), sintasa de ácidos grasos (*FAS*); y en la señalización de insulina: AKT y su fosforilación en la serina 473. La tubulina se utilizó como proteína estructural.

## **7.5 La DTM disminuyó el estrés oxidante en tejido hepático**

Durante la obesidad, hay un exceso en la formación de ER, lo que promueve la oxidación de lípidos y proteínas. Debido a ello se determinaron marcadores de oxidación de lípidos como MDA, grupo carbonil como oxidación de proteínas y las concentraciones de GSH y la relación GSSG/GSH. Debido al consumo de la DAG+S se incrementaron significativamente la cantidad de ER (Figura 13 A-C), la concentración de proteínas oxidadas (Figura 13 D) y la relación GSSG/GSH (Figura 13 F), esto en comparación con las ratas alimentadas con la dieta control. Las ratas obesas que se alimentaron con la DTM o la dieta AIN-93 tuvieron una reducción significativa de ER, MDA (Figura 13 A-C) y de los niveles de proteínas oxidadas (Figura 13 D). Es importante destacar que el grupo DTM tuvo los valores más bajos de estos marcadores de daño oxidante; y además incrementó la concentración de GSH (Figura 13 E). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n = 5). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

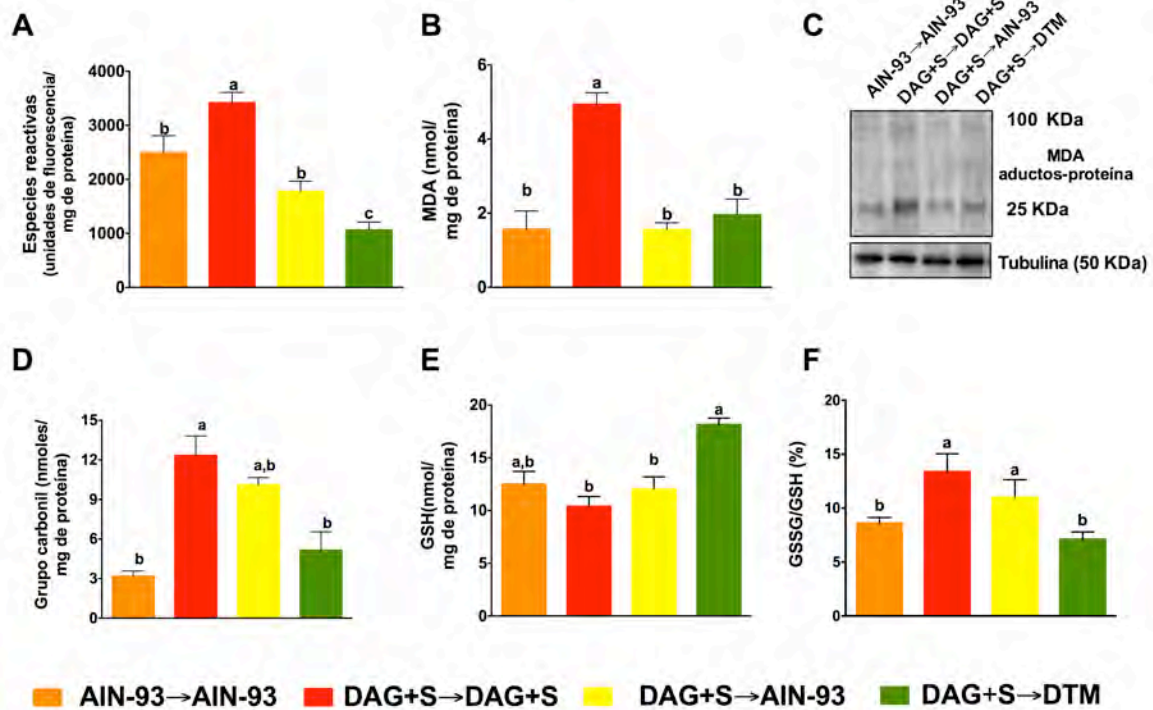


Figura 13. Marcadores de estrés y daño oxidante en tejido hepático. A) cantidad relativa de especies reactivas; B) concentración de malondialdehído (MDA determinado espectrofotométricamente; C) concentración de MDA determinado mediante western blot; D) concentración de proteínas oxidadas; E) concentración de glutatión reducido (GSH) y F) relación glutatión oxidado/ glutatión reducido (GSSG/GSH) (%).

## 7.6 La DTM promueve una disminución de estrés oxidante y daño cognitivo en cerebro

Actualmente se sabe que hay una estrecha relación entre la obesidad, el EO y el deterioro cognitivo. El consumo de DAG+S durante 9 meses incrementó aproximadamente 100% en la concentración de MDA en el cerebro comparado con los otros grupos (Figura 14 A). Sin embargo, las ratas obesas que tuvieron una intervención dietaria con la DTM o la dieta AIN-93 disminuyeron significativamente la concentración de MDA (Figura 14 A). El daño oxidante ocasionado debido al consumo de la DAG+S, se vio reflejado en las alteraciones



en la memoria a corto plazo del grupo DAG+S, ya que presentó mayores tiempos de latencia en la prueba laberinto en T. No obstante, la intervención dietaria con la DTM generó una mejora en la evaluación de la memoria, promoviendo la disminución de estos tiempos de latencia (Figura 14 B, C). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n = 5). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

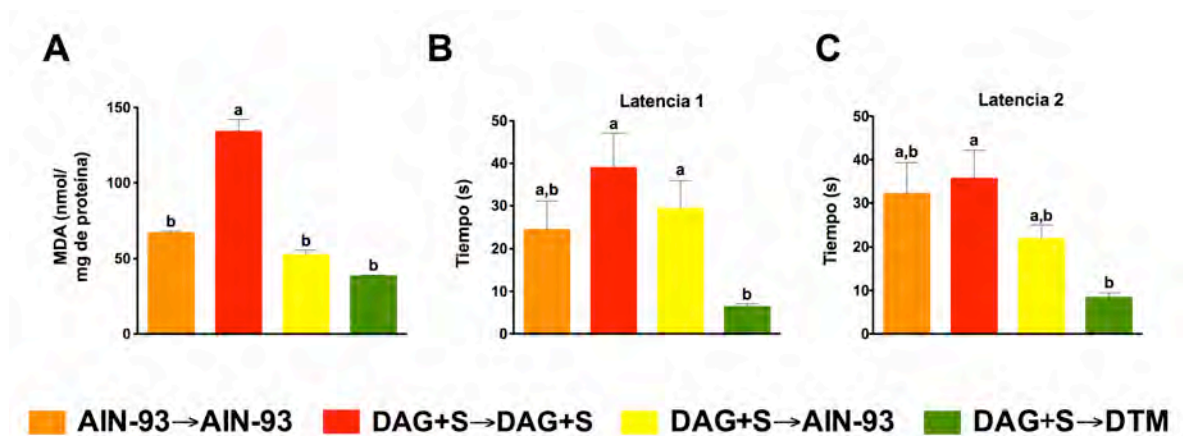


Figura 14. Determinación de un marcador de estrés oxidante y daño cognitivo. A) Concentraciones de malondialdehído (MDA) en cerebro; Prueba de laberinto en T para evaluar la memoria espacial evaluados mediante el tiempo de latencia 1 (B) y tiempo de latencia 2 (C) en los grupos Control, DAG+S, AIN-93 y DTM.

## 7.7 Análisis del tejido adiposo blanco

### 7.7.1 El consumo de la DTM mejoró la funcionalidad del tejido adiposo blanco y redujo el tamaño de los adipocitos

Las modificaciones del TAB durante la obesidad pueden deberse a dos procesos la hiperplasia o la hipertrofia. En el análisis del TAB se observó que el consumo de la DAG+S incrementó área de los adipocitos (Figuras 15 A y B), lo que sugiere un proceso de hipertrofia. Por otra parte, se observó que el tratamiento dietario con la DTM durante 3 meses redujo estadísticamente el tamaño en los adipocitos

(Figuras 15 A y B). Lo anterior esta asociado al tamaño de los adipocitos, lo cual se asoció con la disminución en la relación de la cantidad de triglicéridos en el tejido (triglicéridos/g de tejido) del grupo DTM (Figura 15 C) en comparación con el grupo que consumió DAG+S durante 9 meses.

### **7.7.2 LA DTM moduló la abundancia de ARNm de genes involucrados en proceso de lipogénesis, beta oxidación y adipocinas en tejido adiposo blanco**

Las alteraciones en la estructura del tejido adiposo blanco (TAB) pueden estar relacionadas a los cambios en la cantidad de proteínas, modificaciones que pueden estar asociadas a la modulación de los niveles de RNAm de sus genes. Después del consumo de la DAG+S durante 9 meses, hubo un aumento de los niveles de ARNm de genes involucrados en la lipogénesis como *ChREBP* y *SREBP1-c*, sin embargo la intervención con la DTM disminuyó significativamente la expresión de éstos a niveles similares a los del grupo control (Figura 15 E).

Los niveles adiponectina se ven disminuidos en la obesidad, lo cual concuerda con la disminución que generó el consumo de DAG+S durante 9 meses ( $p < 0.01$ ) (Figura 15 E). A pesar de lo anterior, las ratas obesas que tuvieron la intervención con la DTM tuvieron un aumento significativo en la expresión este gen (Figura 15 E).

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM ( $n = 5$ ). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

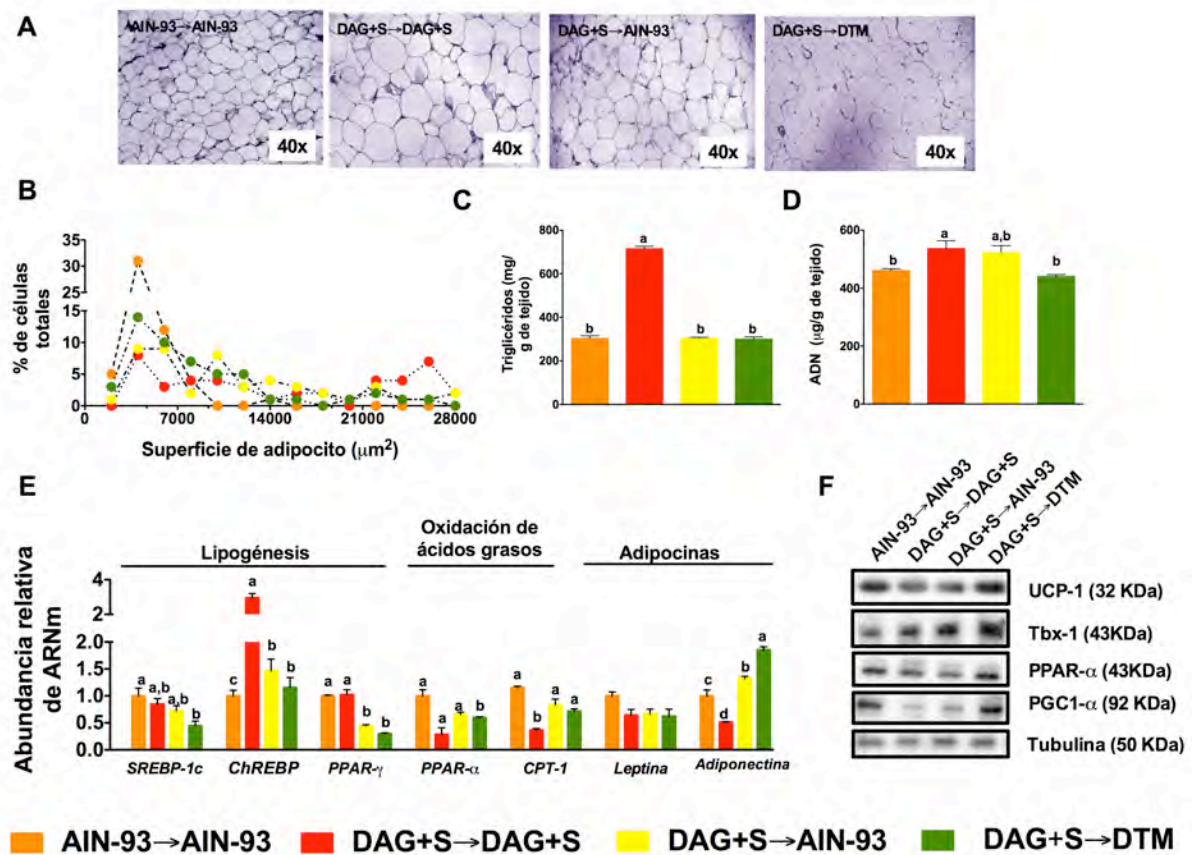


Figura 15. Modificaciones generadas en el tejido adiposo blanco por el consumo de la DTM. **A)** Análisis de la morfología del tejido hepático mediante técnicas histológicas y tinción H&E de los grupos control, DAG+S, AIN-93 y DTM. **B)** Determinación mediante el uso de software Adiposoft® de las áreas superficiales de los adipocitos. **C)** Determinación de la relación triglicéridos/g del tejido adiposo blanco. **D)** Determinación de la concentración de ADN extraído del tejido adiposo. **E)** Determinación mediante PCR en tiempo real de la abundancia relativa de ARNm de genes involucrados en: lipogénesis como proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides 1c (*SREBP-1c*) y proteína de unión a los elementos de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*);  $\beta$ -oxidación como factor de transcripción factor proliferación peroxisomal alfa (*PPAR- $\alpha$* ) y carnitina palmitoil transferasa 1 (*CPT-1*); genes de adipocinas como adiponectina y leptina. E) Determinación mediante western blot de la abundancia de proteínas mediante involucradas en: termogénesis como la proteína desacoplante 1 (UCP-1) y el factor de transcripción caja T (Tbx1) de los grupos Control, DAG+S, AIN93 y DTM. La tubulina se utilizó como proteína estructural.

### **7.7.3 La DTM incrementó la abundancia de proteínas involucrados en proceso de lipogénesis, $\beta$ -oxidación y termogénesis en tejido adiposo blanco**

En la actualidad se considera también al TAB como un órgano metabólicamente activo, y esta característica le permite que sea un órgano productor y secretor de numerosas sustancias que intervienen en la regulación del gasto energético. Debido a ello, se analizó la abundancia de proteínas involucradas en la generación de calor, de tejido adiposo beige y aumento en el gasto energético, como son UCP1, Tbx-1 y PGC1- $\alpha$ . Los resultados fueron muy interesantes, ya se observó que solo con 3 meses de tratamiento dietario con la DTM se incrementó la abundancia de UCP1, Tbx-1, PGC1- $\alpha$  y PPAR- $\alpha$  comparado con los otros grupos (Figura 15 F), lo cual se asocia al incremento de consumo de  $VO_2$  que se observó en este mismo grupo.

### **7.7.4 La DTM indujo el aumento en la abundancia de miR-27b relacionado con el proceso de lipogénesis en tejido adiposo blanco**

Debido a las modificaciones en la expresión de genes observados en el TAB, se decidió analizar la expresión de miR-27, ya que está involucrado en el proceso de adipogénesis. En este análisis se observó que la DAG+S disminuyó la expresión relativa de miR-27 (Figura 16 A), mientras que la DTM incrementó los niveles de este miRNA. Para poder asociar las modificaciones en la expresión de miR-27 a las modificaciones observadas en el TAB se analizó la expresión de su gen blanco PPAR- $\gamma$ , así como también la abundancia en su proteína. Los resultados son acordes a lo observado en el grupo DAG+S, ya que se observó que se incrementó de PPAR- $\gamma$  en este grupo, tanto a nivel génico como de proteína (Figura 16 B,C), mientras que en los grupos DTM y AIN-93 hubo una disminución de PPAR- $\gamma$  (Figura 16 B,C).

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n = 5). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía ) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente

significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

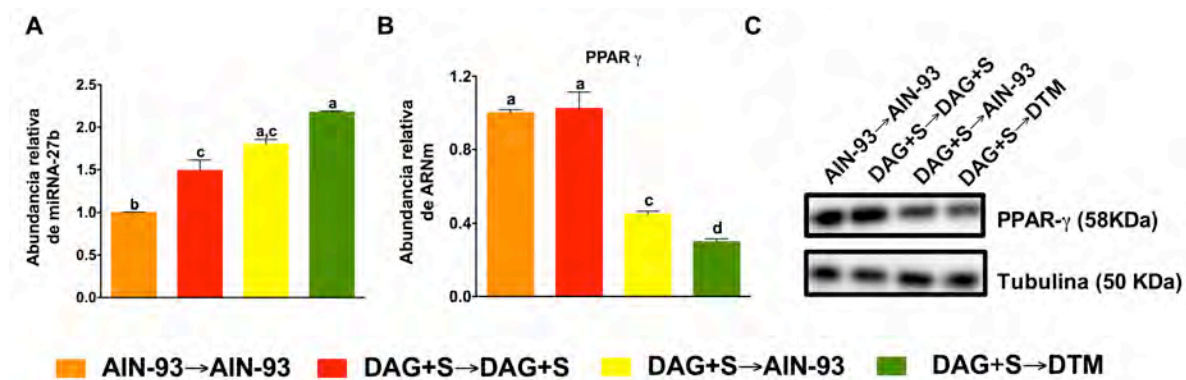


Figura 16. Abundancia relativa de ARNm de reguladores del proceso de adipogénesis en tejido adiposo blanco. A) Abundancia relativa de miR-27, B) Abundancia relativa del ARNm del gen PPAR- $\gamma$  y C) abundancia de proteína de PPAR- $\gamma$  en los grupos Control, DAG+S, AIN-93 y DTM.

## 7.8 La DTM generó modificaciones en la microbiota y en los niveles de GIP y LPS

La obesidad se ha asociado con la modificación de la composición de la microbiota intestinal, promoviendo a una disminución de *Bacteroidetes* y un aumento de *Firmicutes*. Lo anterior es asociado a los que se observó en el grupo DAG+S (Figura 17 A). En contraste, el consumo de la DTM produjo un aumento significativo de *Bacteroidetes* y *Lactobacillus*, así como una disminución en la presencia de *Firmicutes*, los cuales fueron cambios muy similares a los observados en el grupo AIN-93 (Figura 17 A).

Aunque los cambios en la composición de la microbiota fue muy similar en los grupos DTM y AIN-93, es de gran importancia resaltar que sólo la DTM produjo un incremento significativo de la abundancia de *Bifidobacterium* (Figura 17 A).

Además de los cambios observados en la microbiota, los diferentes tratamientos dietarios, generaron modificaciones en los niveles de GIP y LPS. Por una parte, el consumo de la DAG+S estimuló un aumento de 2.4 veces en GIP y 1.9 veces en la concentración de LPS en comparación con el grupo control (Figura 17 B,C). Mientras que los niveles de GIP y LPS se redujeron con el consumo tanto de la DTM como la dieta AIN-93, teniendo valores muy similares al grupo control (Figura 17 B,C). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM (n = 5). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza con un factor (ANOVA de una vía) seguido de la prueba Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Las diferencias entre los grupos se indican mediante letras, donde  $a > b > c$ .

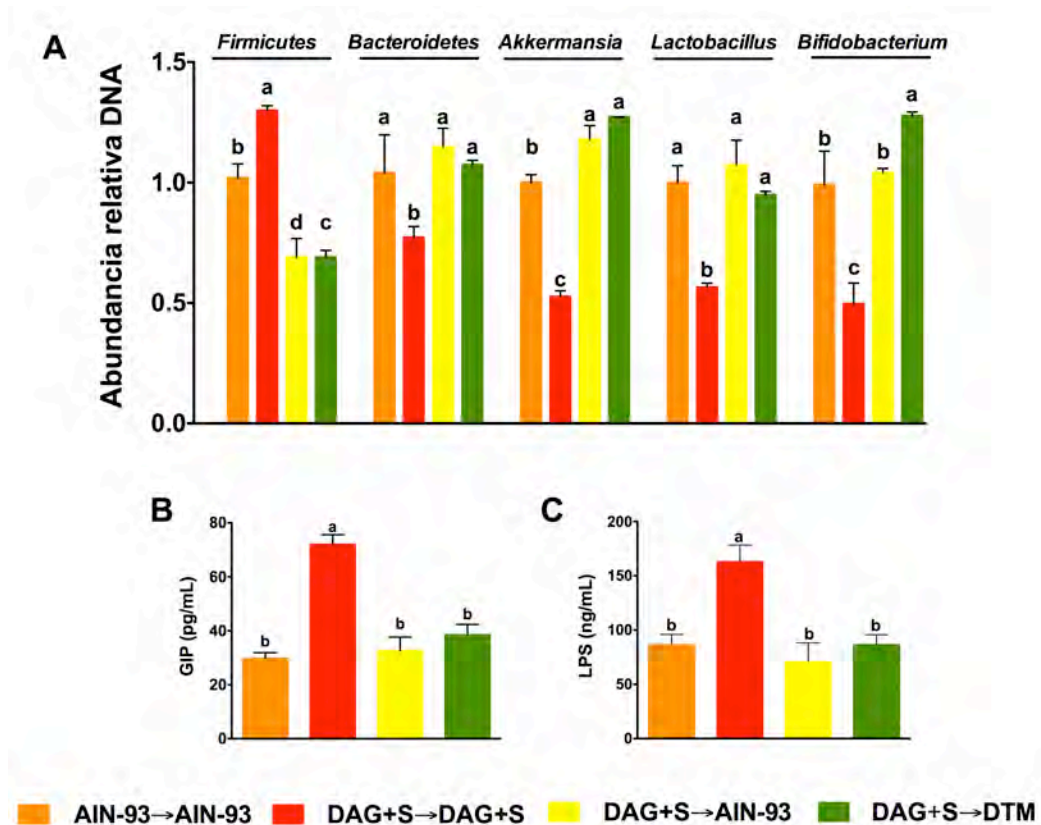


Figura 17. Abundancia relativa de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Akkermansia*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, determinados mediante PCR en muestras de heces; B) concentración sérica de lipopolisacárido (LPS) y los niveles de incretina péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) en los grupos Control, DAG+S, AIN-93 y DTM.

## 8. DISCUSIÓN

En la aculturación se pueden generar modificaciones en los patrones de alimentación, uno de ellos está relacionado con la disminución de la ingesta de alimentos nativos y el aumento de la ingesta de alimentos con alto contenido de grasa y carbohidratos. Estas modificaciones en los patrones de alimentación se han asociado con el aumento en la prevalencia de la obesidad en la población hispanoamericana (3). Debido a lo anterior se han buscado estrategias para disminuir la prevalencia de esta patología y de sus complicaciones, y una de ellas es retomar el consumo de alimentos tradicionales para promover estilos de vida saludables. Sin embargo no existe evidencia acerca de los efectos benéficos por el consumo de la combinación de alimentos tradicionales mexicanos.

El consumo de una dieta alta en grasas y sacarosa durante varios meses promueve diversas alteraciones bioquímicas, así como una falta de flexibilidad metabólica debido a un aumento del flujo de nutrientes a las mitocondrias, lo que conduce a una congestión metabólica (106). Esto es de gran importancia ya que la selección de sustratos para la obtención de energía se produce a nivel mitocondrial, y cuando se pierde esta característica existe una oxidación persistente de una mezcla de lípidos y carbohidratos sin importar el estado fisiológico (106). Esta condición se ha identificado en personas con obesidad y con DT2 (16). Por lo cual, es de esperarse que el cambio en la alimentación, por una dieta más equilibrada mejore los parámetros bioquímicos, promoviendo la reducción de las alteraciones metabólicas. El consumo de la DTM que contiene una combinación adecuada de proteínas vegetales provenientes del frijol y el maíz, un bajo contenido de grasa insaturada (11) y es alta en fibra, generó diversos efectos sobre los parámetros fisiológicos asociados con la reducción del peso corporal. Estos efectos fueron la disminución de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol; y el aumento la tolerancia a la glucosa. Esto a su vez, se vio acompañado por el aumento de las proteínas implicadas en la oxidación de ácidos grasos tales como PPAR- $\alpha$ , UCP-1, Tbx-1 y el co-activador PGC1- $\alpha$ . El incremento de estas proteínas se ha asociado al consumo de diversos

compuestos o alimentos como la quercetina (107), polifenoles presentes en el té (108), el resveratrol presente en el vino (109), así como también las semillas de chía (110) por mencionar algunos. Por ello, uno de los cambios más importantes fue el aumento de PGC1- $\alpha$  que sugiere una mejora en la función mitocondrial, lo que puede reflejarse en un aumento del gasto de energía (111), lo cual se observó en el grupo que consumió DTM al incrementar el  $VO_2$ .

Además de las modificaciones en la abundancia de proteínas termogénicas, otras regulaciones generadas en el tejido adiposo por el consumo de la DTM pueden deberse al efecto de diversos nutrimentos y compuestos bioactivos sobre diversas vías de señalización, factores de transcripción y otros reguladores potenciales, como miRNA, los cuales están implicados en la regulación de la expresión génica. Estudios anteriores han demostrado que la suplementación con polifenoles y ácidos grasos poliinsaturados pueden modular la expresión de los miRNA en el TAB (112). El consumo de la DTM, la cual contiene ácidos grasos poliinsaturados y polifenoles estimuló la expresión del miR-27, éste modular la expresión de PPAR- $\gamma$  mediante la unión a la región promotora 3 UTR de este gen, lo cual puede disminuir el proceso adipogénico. Estos resultados también pueden explicar el por qué las ratas obesas alimentadas con la DTM tuvieron el menor peso corporal que los grupos que fueron alimentados con DAG+S. Asociado a las modificaciones observadas en estas proteínas y el aumento del gasto energético, se observó que en el grupo DTM hubo una disminución del tamaño de los adipocitos y de la concentración de los triglicéridos del hígado, además en la concentración de leptina, la cual se asocia directamente con la cantidad de TAB (19). Lo anterior sugiere que el consumo de la DTM aumentó la capacidad termogénica del TAB posiblemente en parte debido a la generación de tejido adiposo beige. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se ha demostrado que el consumo de ciertos polifenoles como la quercetina estimula la generación de tejido adiposo beige [36].

La quercetina es uno de los compuestos antioxidantes que se encontraron en la DTM, así como también el kaempferol, el catecol y el ácido clorogénico. Asociado con la presencia de estos compuestos polifenólicos, se observó que la actividad



antioxidante de la combinación de alimentos (DTM) fue 10 veces mayor que la dietas control o la DAG. La actividad antioxidante de la DTM reduce sustancialmente la formación de ER, lo cual se asocia con una mejora de la sensibilidad a la insulina (113). Además el consumo de la DTM provocó una regularización del uso de sustratos, ya que generó una disminución en la inflexibilidad metabólica generada por el consumo de la DAG+S. Lo anterior se reflejó en una disminución en la producción de ER, la concentración de proteínas oxidadas y la relación GSSG/GSH después del consumo de la DTM. La modificaciones mencionadas anteriormente pueden asociarse directamente con la presencia de los compuestos antioxidantes, esto es de gran importancia ya que estos resultados son muy similares a los efectos benéficos que se observan con el consumo de 340 mL de té, ya que se observó una disminución significativa del peso corporal, en los niveles de MDA (63%), así como también incrementó los niveles de GSH (114).

Otros efectos debido al consumo de antioxidantes sobre la obesidad pueden deberse a distintos mecanismos de acción. Por ejemplo, la mejora en el estado redox del grupo que consumió la DTM pudo generarse al disminuir la cantidad de las ER, así como también al aumentar antioxidantes endógenos como el GSH, lo cual promovió la disminución de marcadores de daño oxidante. La acumulación de productos oxidados por las ER en el sistema nervioso está asociado a la generación de daño cognitivo y a la pérdida de memoria (47, 115). Uno de los mecanismos implicados en este proceso, es debido a que el EO favorece la hiperfosforilación de Tau (116). La proteína Tau en las neuronas normalmente estabiliza los microtúbulos, siendo esencial para el transporte axonal y por ende, para la función neuronal. Sin embargo cuando se hiperfosforila esta proteína forma agregados perdiendo su habilidad para estabilizar los microtúbulos, y favoreciendo eventualmente la muerte neuronal (117). Considerando lo anterior, un factor de gran importancia sobre los procesos cognitivos es la alimentación. Se han identificado efectos benéficos sobre alteraciones en la memoria debido al consumo de compuestos como la curcumina (118, 119) y los omegas-3 (120), los

cuales mejoran el proceso cognitivo a través de su efecto en la plasticidad sináptica. En la actualidad no existen muchos estudios que muestre los efectos de los alimentos sobre la función cognitiva. Por ello es de gran importancia resaltar que la DTM, además disminuir de anomalías metabólicas, tuvo una mejora en la memoria espacial lo cual está relacionado con la disminución de la concentración de MDA en el cerebro. Estudios demuestran la relación que existe entre la disminución de los niveles de MDA y el aumento de la densidad de neuronas colinérgicas, los cuales son factores que promueven la mejora de la memoria espacial (121).

Otra de las consideraciones que se deben tomar en cuenta entre el grupo que consumió la DTM y el grupo AIN-93 es la presencia de sacarosa en las dietas. La adición de sacarosa en las dietas se ha asociado en muchos estudios con la generación de obesidad, RI e hígado graso (122). La DTM no contenía sacarosa, lo cual pudo tener un impacto sobre el incremento en los niveles de adiponectina observados en este grupo. El aumento de adiponectina tiene gran relevancia sobre el metabolismo hepático, ya que impide la producción hepática de glucosa por la disminución de las expresiones del ARNm de dos enzimas fundamentales de la gluconeogénesis: la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfatasa, regulando de esta manera la utilización adecuada de sustratos (123).

En la época prehispánica las principales fuentes de grasa se obtenían del consumo de diversas semillas como la de calabaza y de la chía. La semilla de calabaza es baja en grasas saturadas como el ácido esteárico el cual que está implicado en el desarrollo de esteatosis hepática. Las semillas de chía son ricas en ácidos grasos omega 3 y ácido oleico, lo cual proporciona una relación adecuada de omega-6/omega-3 (2:1) de acuerdo a la Organización Mundial de la salud y otros reportes (124, 125). Esta relación es de gran importancia ya que en la actualidad esta relación incrementó de 3:1 a 15:1 (7). Lo anterior indica una deficiencia en ácidos grasos omega-3 y cantidades excesivas de ácidos grasos omega-6 en los patrones dietarios establecidos anteriormente, en base a los

cuales se establecieron patrones genéticos. Además el aumento del consumo de omega-6 en la dieta promueve la generación de productos metabólicos como las prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, asociados directamente con procesos inflamatorios (126).

Hay evidencia de que los ácidos grasos poliinsaturados son ligandos naturales de PPAR- $\alpha$ , el cual es un factor de transcripción que activa la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (127). Uno de los resultados más importantes en este trabajo fue la identificación de EPA y DHA en la semilla de calabaza, ya que estos compuestos se encuentran mayoritariamente en alimentos de origen marino (128, 129). Además de asociarlo a los estudios previos que han demostrado que las dietas ricas en EPA y DHA previenen el crecimiento excesivo de tejido adiposo visceral en ratas alimentadas o bien un alto contenido de grasa o una dieta alta en sacarosa (130), resultados similares a lo observado en el presente estudio.

En el desarrollo de la obesidad no solo están implicadas procesos que promuevan alteraciones en el hígado y el TAB. Estudios recientes demuestran que la microbiota intestinal contribuye a la fisiopatología de la obesidad. Además, está relacionada con la modulación de péptidos intestinales implicados en el control de la homeostasis de la glucosa, y esto se asocia con la disminución de las alteraciones metabólicas. El consumo de fibra prebiótica puede modular de la microbiota intestinal, disminuyendo los factores de riesgo para generación de la obesidad y el síndrome metabólico. Algunos alimentos de la DTM, como el nopal deshidratado, las semillas de chía y de calabaza, son excelentes fuentes de fibra soluble e insoluble que pueden funcionar como prebióticos. El nopal contiene mucílago, el cual contiene arabinosilanos (131), compuestos que son considerados prebióticos (132, 133).

Para obtener un análisis más preciso de la microbiota intestinal, se analizaron diversos microorganismos presentes en las heces de las ratas al finalizar el protocolo. De acuerdo con investigaciones anteriores [45], el consumo excesivo de

grasa genera un aumento significativo en la relación de *Firmicutes/Bacteroidetes* durante la obesidad, lo cual fue similar a lo observado en el grupo DAG+S, sin embargo esta relación se invirtió durante la intervención dietaria con la DTM. Otra de las modificaciones que genera efectos benéficos debido a los cambios en la microbiota es debido al consumo de prebióticos, lo cual se ha asociado con aumento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Akkermansia* (134). El aumento de estos microorganismos está asociado a la disminución de la intolerancia a la glucosa, disminución de peso corporal y de tejido adiposo, generando así una mejora metabólica. La microbiota intestinal puede actuar a través del aumento de diferentes proteínas como PGC-1 $\alpha$  y otros genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, así como también un aumento en la actividad de AMPK en el músculo y el hígado que conduce al incremento de la fosforilación de ACC, que a su vez disminuye la producción de la malonil-CoA. Lo anterior permite la activación de la enzima CPT1, incrementando la oxidación mitocondrial de ácidos grasos (135). Nuestros resultados muestran que el consumo de la DTM aumentó significativamente *Bifidobacterium* en mayor medida que la dieta de control, lo que indica que la DTM puede contener algunos alimentos con efectos prebióticos. Es decir, un crecimiento de la promoción de bacterias potencialmente protectoras (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) (136).

## 9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados apoyan el consumo de alimentos presentes en la DTM disminuyó las alteraciones bioquímicas como los niveles séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos. Además promovió una mejora metabólica en el tejido adiposo blanco ya que se disminuyó el tamaño de los adipocitos, y generó un tejido funcional que se reflejó en el aumento del gasto energético. La presencia de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la DTM se asoció con la disminución en la abundancia del ARNm de los genes involucrados en la lipogénesis como *SREBP-1c* y *ChREBP*, lo cual redujo considerablemente la generación de hígado graso. Así como también, los compuestos polifenólicos confirieron una mayor actividad antioxidante en la DTM y un aumento en la abundancia del ARNm del gen de la catalasa y de la concentración de GSH, lo cual provocó una disminución del estrés oxidante al reducir de los marcadores de daño oxidante como el MDA; lo anterior también se vio reflejado en la mejora en la memoria.

Adicionalmente se demostró que la fibra presente en la DTM promovió la regulación del metabolismo de carbohidratos al mejorar la tolerancia a la glucosa e incrementar los niveles de adiponectina. Lo anterior puede ser debido a la modulación metabólica que se generó por la modificación de la microbiota debido a la presencia de compuestos con efectos prebióticos (fibra) que incrementaron la abundancia de *Bifidobacterium*.

Por lo anterior la DTM podría ser una estrategia dietaria de bajo costo y de fácil acceso para la población mexicana para reducir alteraciones metabólicas observadas durante la obesidad.

## **10. PERSPECTIVAS**

De acuerdo a los resultados obtenidos se sugieren experimentos que contemplen investigaciones experimentales en seres humanos, con el objetivo de poder extrapolar estos efectos benéficos a la población mexicana y de esta manera poder concretar la estrategia dietaria para disminuir la obesidad y las complicaciones presentes en esta patología en México. Por lo cual se tendría que evaluar la forma de consumo de estos alimentos, así como también las cantidades adecuadas para la población.

## 11. REFERENCIAS

1. Iturriaga J. Las cocinas de México I. Económica FdC, editor2000.
2. Ramos-Elorduy J. Los insectos como una fuente de proteínas en el futuro en la alimentación del futuro. UNAM, editor. Mexico D.F.1987.
3. Satia-Abouta J, Patterson RE, Neuhouser ML, Elder J. Dietary acculturation: applications to nutrition research and dietetics. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(8):1105-18.
4. Rivera JA, Barquera S, Campirano F, Campos I, Safdie M, Tovar V. Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr.* 2002;5(1A):113-22.
5. Hernández B dHJ, Barquera S, Monterrubio E, Rivera J, Shamah T, Sepúlveda J, Haas J, Campirano F. Factors associated with physical activity among Mexican women of childbearing age. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;14.
6. Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med.* 1985;312(5):283-9.
7. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.* 2016;8(3):128.
8. Bernardino de Sahagún CMdB, José Servando Teresa de Mier Noriega y Guerra. Historia general de las cosas de Nueva España. México IdcAVs, editor1829.
9. Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(4):R882-92.
10. Gao Q, Horvath TL. Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:367-98.
11. Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, et al. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav.* 2004;83(4):573-8.
12. Zhang L, Bruce-Keller AJ, Dasuri K, Nguyen AT, Liu Y, Keller JN. Diet-induced metabolic disturbances as modulators of brain homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(5):417-22.
13. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance,

dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6184-223.

14. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(1):7-18.

15. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998;14(4):263-83.

16. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 1):E1130-41.

17. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324.

18. Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3):R199-222.

19. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 2008;39(8):715-28.

20. Konner AC, Bruning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 2012;16(2):144-52.

21. Mather KJ, Goldberg RB. Clinical use of adiponectin as a marker of metabolic dysregulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(1):107-17.

22. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes.* 2003;52(7):1779-85.

23. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev.* 2012;13 Suppl 2:83-96.

24. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.

25. Ricquier D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. *C R Biol.* 2006;329(8):578-86; discussion 653-5.

26. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-7.



27. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.
28. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(1):E19-31.
29. Thomason MK, Storz G. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet*. 2010;44:167-88.
30. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, et al. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*. 2009;10:478.
31. Alisi A, Da Sacco L, Bruscalupi G, Piemonte F, Panera N, De Vito R, et al. Mirnome analysis reveals novel molecular determinants in the pathogenesis of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest*. 2011;91(2):283-93.
32. Park JH, Ahn J, Kim S, Kwon DY, Ha TY. Murine hepatic miRNAs expression and regulation of gene expression in diet-induced obese mice. *Mol Cells*. 2011;31(1):33-8.
33. Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J*. 2009;276(8):2348-58.
34. Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Bronneke HS, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):434-46.
35. Joven J, Espinel E, Rull A, Aragones G, Rodriguez-Gallego E, Camps J, et al. Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):894-9.
36. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(2):139-43.
37. Zambo V, Simon-Szabo L, Szelenyi P, Kereszturi E, Banhegyi G, Csala M. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol*. 2013;5(10):550-7.
38. Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology*. 2002;180(1):45-63.
39. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*. 2001;8(7):797-807.

40. Park K, Gross M, Lee DH, Holvoet P, Himes JH, Shikany JM, et al. Oxidative stress and insulin resistance: the coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1302-7.
41. Greabu M, Olinescu R. The formation of oxidative stress condition in the experimental chemically induced hepatotoxicity. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2002;47:86-94.
42. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1752-61.
43. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*. 2010;219(1-2):25-32.
44. White CL, Pistell PJ, Purpera MN, Gupta S, Fernandez-Kim SO, Hise TL, et al. Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiol Dis*. 2009;35(1):3-13.
45. Nyaradi A, Foster JK, Hickling S, Li J, Ambrosini GL, Jacques A, et al. Prospective associations between dietary patterns and cognitive performance during adolescence. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014;55(9):1017-24.
46. Eskelinen MH, Ngandu T, Helkala EL, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, et al. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2008;23(7):741-7.
47. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem*. 2010;114(6):1581-9.
48. Winocur G, Moscovitch M, Caruana DA, Binns MA. Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia*. 2005;43(11):1580-90.
49. Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2010;482(3):235-9.
50. Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016;535(7610):56-64.
51. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, et al. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2015;22(3):516-30.

52. Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein PC, Mazmanian SK. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.* 2014;20(5):719-30.
53. Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness. *Shock.* 2007;28(4):384-93.
54. Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, Larsen N, Molbak L. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics.* 2013;14:788.
55. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 2011;6(3):209-40.
56. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1178-86.
57. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1716-24 e1-2.
58. Mueller C, Macpherson AJ. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut.* 2006;55(2):276-84.
59. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003;361(9356):512-9.
60. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718-23.
61. Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT. Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(1):25-54.
62. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401-12.
63. Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K, Fagarasan S. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol.* 2008;20(1):59-66.
64. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):7493-519.
65. Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30(1):17-25.

66. Ljungh A, Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2006;7(2):73-89.
67. Bongaerts G, Severijnen R, Timmerman H. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses.* 2005;64(1):64-8.
68. Trigueros L, Pena S, Ugidos AV, Sayas-Barbera E, Perez-Alvarez JA, Sendra E. Food ingredients as anti-obesity agents: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(9):929-42.
69. Peregrin T. The new frontier of nutrition science: nutrigenomics. *J Am Diet Assoc.* 2001;101(11):1306.
70. McMurry MP, Cerqueira MT, Connor SL, Connor WE. Changes in lipid and lipoprotein levels and body weight in Tarahumara Indians after consumption of an affluent diet. *N Engl J Med.* 1991;325(24):1704-8.
71. Ayerza R, Coates W. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 2007;51(1):27-34.
72. Chicco AG, D'Alessandro ME, Hein GJ, Oliva ME, Lombardo YB. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *Br J Nutr.* 2009;101(1):41-50.
73. Makni M, Fetoui H, Gargouri NK, Garoui el M, Jaber H, Makni J, et al. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(12):3714-20.
74. Lopez-Romero P, Pichardo-Ontiveros E, Avila-Nava A, Vazquez-Manjarrez N, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, et al. The effect of nopal (*Opuntia ficus indica*) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in Mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts. *J Acad Nutr Diet.* 2014;114(11):1811-8.
75. Moran-Ramos S, Avila-Nava A, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, Lopez-Romero P, Torres N. *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats. *J Nutr.* 2012;142(11):1956-63.
76. Chavez-Santoscoy RA, Gutierrez-Urbe JA, Granados O, Torre-Villalvazo I, Serna-Saldivar SO, Torres N, et al. Flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats modulate lipid metabolism and biliary cholesterol secretion in C57BL/6 mice. *Br J Nutr.* 2014;112(6):886-99.

77. Puzstai A, Grant G, Buchan WC, Bardocz S, de Carvalho AFFU, Ewen SWB. Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. *British Journal of Nutrition*. 1998;79(2):213-21.
78. Ghavipour M, Saedisomeolia A, Djalali M, Sotoudeh G, Eshraghyan MR, Moghadam AM, et al. Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females. *Br J Nutr*. 2013;109(11):2031-5.
79. Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br J Nutr*. 2013;110(10):1803-9.
80. Luvizotto RA, Nascimento AF, Miranda NC, Wang XD, Ferreira AL. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. *Hum Exp Toxicol*. 2015;34(6):612-9.
81. Fernandez ML, Trejo A, Mcnamara DJ. Pectin Isolated from Prickly Pear (*Opuntia Sp*) Modifies Low-Density-Lipoprotein Metabolism in Cholesterol-Fed Guinea-Pigs. *Journal of Nutrition*. 1990;120(11):1283-90.
82. Fernandez ML, Lin ECK, Trejo A, Mcnamara DJ. Prickly Pear (*Opuntia Sp*) Pectin Reverses Low-Density-Lipoprotein Receptor Suppression Induced by a Hypercholesterolemic Diet in Guinea-Pigs. *Journal of Nutrition*. 1992;122(12):2330-40.
83. Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, Efthimiou Y, Stamatopoulos Y, Sinzinger H. Regular ingestion of *opuntia robusta* lowers oxidation injury. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2001;65(1):45-50.
84. Moran-Ramos S, Avila-Nava A, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, Lopez-Romero P, Torres N. *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *Journal of Nutrition*. 2012;142(11):1956-63.
85. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
86. Rodriguez-Rodriguez C, Torres N, Gutierrez-Urbe JA, Noriega LG, Torre-Villalvazo I, Leal-Diaz AM, et al. The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food Funct*. 2015;6(3):805-15.

87. Quiñones Peña A. Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
88. Hernández DP, Martín, G. O., Rodríguez, P. V., & Ganeme, B. F. . Aplicaciones de las lectinas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999;15(2):9-15.
89. Chiun Chuang R. Wang SKCC. Effect of selected canning methods on trypsin inhibitor activity, sterilization value, and firmness of canned navy beans. Journal Agriculture Food Chemistry. 1988;36(5):1015–8.
90. Jourdan G, Noreña, C. P., & Brandelli, A. . Inactivation of Trypsin Inhibitor Activity from Brazilian Varieties of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). . Food Science and Technology International. 2007;13(13):195-8.
91. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226(1):497-509.
92. Barakat HA, Dohm GL, Loesche P, Tapscott EB, Smith C. Lipid content and fatty acid composition of heart and muscle of the BIO 82.62 cardiomyopathic hamster. Lipids. 1976;11(10):747-51.
93. Tovar AR, Diaz-Villasenor A, Cruz-Salazar N, Ordaz G, Granados O, Palacios-Gonzalez B, et al. Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. Arch Med Res. 2011;42(6):540-53.
94. Reyes-Caudillo ET, A; Valdivia-López, M.A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry. 2008;107:656-63.
95. Tsao R, Yang R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 2003;1018(1):29-40.
96. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Agric Food Chem. 2002;50(16):4437-44.
97. Contreras AV, Rangel-Escareno C, Torres N, Aleman-Escondrillas G, Ortiz V, Noriega LG, et al. PPARalpha via HNF4alpha regulates the expression of genes encoding hepatic amino acid catabolizing enzymes to maintain metabolic homeostasis. Genes Nutr. 2015;10(2):452.

98. Diaz-Villasenor A, Granados O, Gonzalez-Palacios B, Tovar-Palacio C, Torre-Villalvazo I, Olivares-Garcia V, et al. Differential modulation of the functionality of white adipose tissue of obese Zucker (fa/fa) rats by the type of protein and the amount and type of fat. *J Nutr Biochem*. 2013;24(11):1798-809.
99. Velazquez-Villegas LA, Tovar AR, Lopez-Barradas AM, Torres N. The dietary protein/carbohydrate ratio differentially modifies lipogenesis and protein synthesis in the mammary gland, liver and adipose tissue during gestation and lactation. *PLoS One*. 2013;8(7):e69338.
100. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992;13(3):637-48.
101. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 1998;11(10):1176-83.
102. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994;233:357-63.
103. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006;1(6):3159-65.
104. Deacon RM, Rawlins JN. T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc*. 2006;1(1):7-12.
105. Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(11):4605-14.
106. Muoio DM. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell*. 2014;159(6):1253-62.
107. Castrejon-Tellez V, Rodriguez-Perez JM, Perez-Torres I, Perez-Hernandez N, Cruz-Lagunas A, Guarner-Lans V, et al. The Effect of Resveratrol and Quercetin Treatment on PPAR Mediated Uncoupling Protein (UCP-) 1, 2, and 3 Expression in Visceral White Adipose Tissue from Metabolic Syndrome Rats. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
108. Chen N, Bezzina R, Hinch E, Lewandowski PA, Cameron-Smith D, Mathai ML, et al. Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res*. 2009;29(11):784-93.

109. Crowley VE, Yeo GS, O'Rahilly S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(4):276-86.
110. Marineli Rda S MC, Moraes ÉA, Lenquiste SA, Lollo PC, Morato PN, Amaya-Farfan J, Maróstica MR Jr. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition.* 2015;31(5):740-8.
111. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012;26(3):271-81.
112. Baselga-Escudero L, Blade C, Ribas-Latre A, Casanova E, Salvado MJ, Arola L, et al. Chronic supplementation of proanthocyanidins reduces postprandial lipemia and liver miR-33a and miR-122 levels in a dose-dependent manner in healthy rats. *J Nutr Biochem.* 2014;25(2):151-6.
113. Jimenez-Gomez Y, Mattison JA, Pearson KJ, Martin-Montalvo A, Palacios HH, Sossong AM, et al. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab.* 2013;18(4):533-45.
114. Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, et al. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):122-9.
115. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. *Nutrients.* 2015;7(8):6719-38.
116. Pratico D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:70-8.
117. Polydoro M, Acker CM, Duff K, Castillo PE, Davies P. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci.* 2009;29(34):10741-9.
118. Dong S, Zeng Q, Mitchell ES, Xiu J, Duan Y, Li C, et al. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS One.* 2012;7(2):e31211.
119. Xu Y, Lin D, Li S, Li G, Shyamala SG, Barish PA, et al. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacology.* 2009;57(4):463-71.
120. Crupi R, Marino A, Cuzzocrea S. n-3 fatty acids: role in neurogenesis and neuroplasticity. *Curr Med Chem.* 2013;20(24):2953-63.



121. Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-Mee W, Ingkaninan K, Wittaya-Areekul S. *Mangifera indica* fruit extract improves memory impairment, cholinergic dysfunction, and oxidative stress damage in animal model of mild cognitive impairment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:132097.
122. Lima ML, Leite LH, Gioda CR, Leme FO, Couto CA, Coimbra CC, et al. A Novel Wistar Rat Model of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Sucrose-Rich Diet. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9127076.
123. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439-51.
124. Grigg S. Prévention en pratique médicale. *Bulletin de la direction de santé publique de montréal*.2004.
125. Blandeau N, Schneider, S.M.,. Omega-3 Fatty acids for mother and child health. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2006;20:68-72.
126. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991;54(3):438-63.
127. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2014;53:124-44.
128. Chukwuemeka U, G. I. Ndukwe, and T. O. Audu. . Comparison of fatty acids profile of some freshwater and marine fishes. *Int. J. Food. Safety*. 2008;10:9-17.
129. Pirestani S, M. A. Sahari, M. Barzegar, and H. Nikoopour. Lipid, cholesterol and fatty acid profile of some commercially important fish species from south Caspian Sea. *J. Food Biochem*. 2010;34:886–95.
130. Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem*. 2006;17(1):1-13.
131. Olivares-Perez A T-LS, Padilla-Velasco Ana, L. Nopal Cactus (*Opuntia Ficus-Indica*) as a holographic material. *Materials*. 2012;5:2383–402.
132. Delzenne NM, Neyrinck AM, Backhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(11):639-46.
133. Cluny NL, Eller LK, Keenan CM, Reimer RA, Sharkey KA. Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(4):769-78.
134. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in

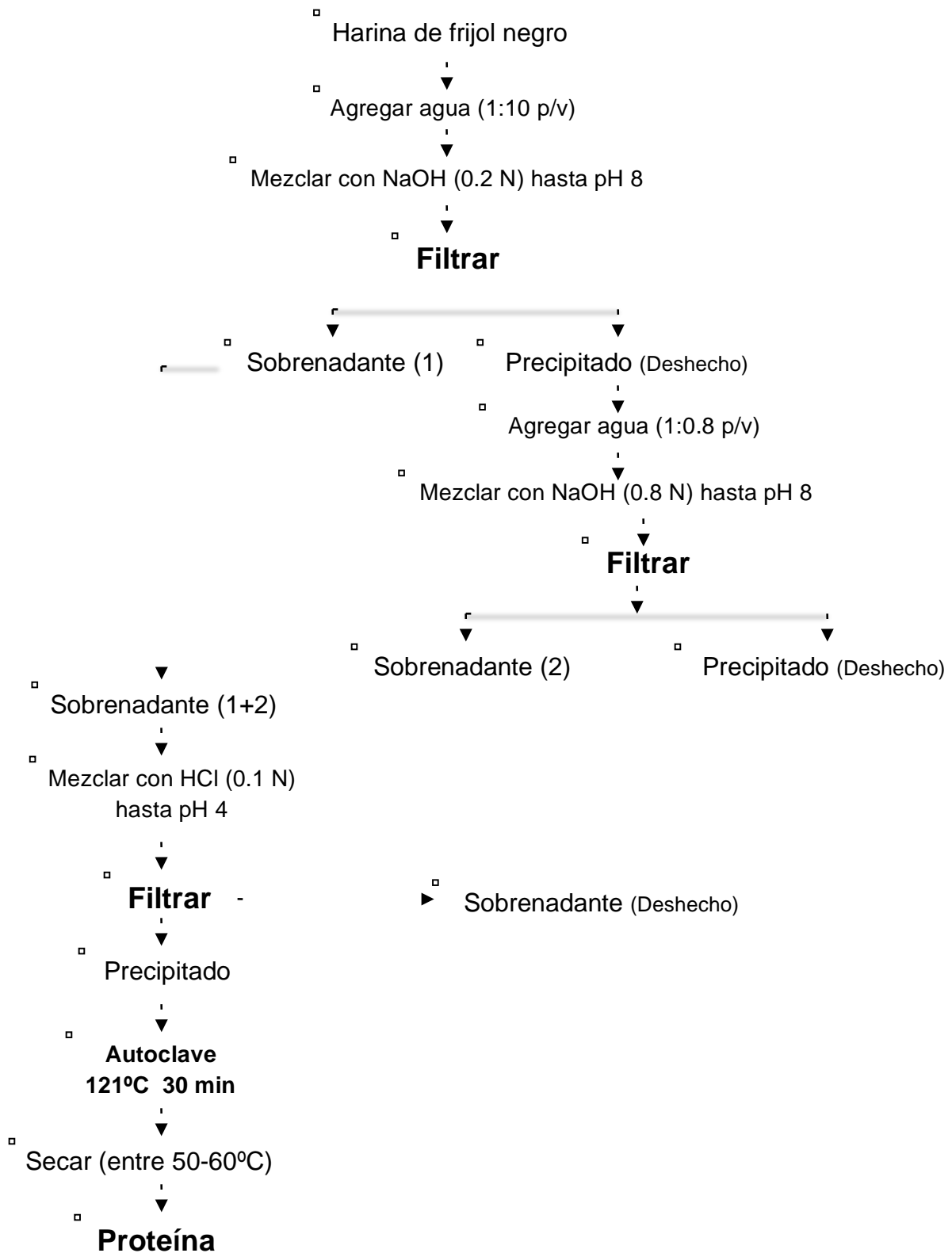
genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*. 2011;60(11):2775-86.

135. Villanueva-Millan MJ, Perez-Matute P, Oteo JA. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem*. 2015;71(3):509-25.

136. de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2008;111:1-66.

## ANEXO 1

Figura S1. Diagrama de flujo para obtener la proteína de frijol (tomado y modificado de 87).



## ANEXO 2

**Tabla S1. Composición química de los alimentos que forman parte de la DTM**

Alimento	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Fibra	Minerales
Almidón	80.8	4	5	2.8	0.024
Frijol	12.5	71	0.2	0.5	6
Semilla de chía	8.9	17.9	27.3	36	4.5
Nopal	14.1	20.2	0.3	39	0.26
Semilla de calabaza	43.8	18.6	19.4	18.4	0.3
Jitomate	4.3	0.6	0.2	1.2	0.025

El análisis de alimentos se realizó en el departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la UNAM.

**Tabla S2. Cantidades utilizadas de cada alimento para ajustar la DTM a los requerimientos de la AIN-93. Los datos se expresan como g de cada alimento en 100g de dieta.**

Alimento	Cantidad (g)	Proteína	Carbohidratos	Lípidos	Fibra	Minerales
Almidón de maíz	55.0	2.2	44.4	2.8	1.5	0.01
Proteína de frijol	20.5	14.6	2.6	0.04	0.1	1.2
Semilla de chía	5.0	0.9	0.5	1.4	1.8	0.2
Nopal	3.5	0.7	0.5	0.01	1.4	0.01
Semilla de calabaza	12	2.2	5.3	2.3	2.2	0.0
Jitomate	0.5	0.0	0.02	0.00	0.01	0.0
<b>DTM</b>	<b>Total</b>	<b>20.5</b>	<b>53.2</b>	<b>6.5</b>	<b>7.0</b>	<b>1.5</b>
<b>AIN-93</b>	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>59.4</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3.5</b>

### ANEXO 3

Las secuencias de las sondas SYBR® Green que se utilizaron en el presente estudio fueron diseñadas por nosotros. Utilizamos la base de datos **Pubmed** para la búsqueda de la secuencia del ARNm del gen de interés de la especie *rattus norvegicus*. Posteriormente se utilizó el programa **e!Ensembl** para identificar las secuencias codificantes de éste ARNm, una vez que se identificaron se utilizó el programa **Primer 3** para generar secuencias de las sondas. Las sondas se sintetizaron por compañía SIGMA-ALDRICH. Las sondas Taqman para los genes de las enzimas antioxidantes se reportaron anteriormente por Morán-Ramos S; *et al.*, 2012 (75).

Tabla S3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el sistema SYBR® Green y sondas Taqman.

Gene	Oligonucleótido	Secuencia
<b>Expresión génica</b>		
<i>SREBP1c</i>	Sentido	CGTTGTACTGCAGCCACACT
	Anti-sentido	AGTGGTACTGTGGCCAGGAT
<i>ChREBP</i>	Sentido	ACTGGAACCTTCCACTGTGC
	Anti-sentido	CTCTCTGCTTTGGGGACAAC
<i>PPAR-α</i>	Sentido	GCGTACGACAAGTGTGATCG
	Anti-sentido	GCCAGAGATTTGAGGTCTGC
<i>PPAR-γ</i>	Sentido	CGAGTCTGTGGGGATAAAGC
	Anti-sentido	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG
<i>CPT-1</i>	Sentido	AGCAGAGGCTCAAGCTGTTC
	Anti-sentido	ACAACCTCCATGGCTCAGAC
<i>TNF-α</i>	Sentido	ATGTGGAAGTGGCAGAGGAG
	Anti-sentido	GCCATGGAAGTGGCAGAGG
<i>IL-6</i>	Sentido	ACCACCCACAACAGACCAGT
	Anti-sentido	CGGAACTCCAGAAGACCAGA
<i>Leptina</i>	Sentido	CCTGTGGCTTTGGTCCTATC
	Anti-sentido	TGATAGACTGCCAGGGTCTG
<i>Adiponectina</i>	Sentido	GATGGCACTCCTGGAGAGAA
	Anti-sentido	CCTACGCTGAATGCTGAGTG

<b>Expresión de miRNA</b>		
rho-miR-27b-3p		UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
<b>Abundancia de microbiota</b>		
<i>Firmicutes</i>	Sentido	GCGTGAGTGAAGAAGT
	Anti-sentido	CTACGCTCCCTTTACAC
<i>Bacteroidetes</i>	Sentido	AACGCTAGCTACAGGCTTAACA
	Anti-sentido	ACGCTACTTGGCTGGTTCA
<i>Akkermansia</i>	Sentido	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
	Anti-sentido	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT
<i>Lactobacillus</i>	Sentido	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
	Anti-sentido	CACCGCTACACATGGAG
<i>Bifidobacterium</i>	Sentido	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG
	Anti-sentido	CCACATCCAGC(A/G)TCCAC
Universal	Sentido	CGGTGAATACGTTCCCGG
	Anti-sentido	TACGGCTACCTTGTTACGACTT
<b>Taqman</b>		
<i>Catalasa (Cat)</i>		Rn01423343_m1
<i>Glutación peroxidasa (Gpx)</i>		Rn00588153_m1
<i>Glutación reductasa (Gr)</i>		Rn99999088_g1
<i>Superóxido dismutasa 1 (Sod1)</i>		Rn00560930-m1

# Publicación

## RESEARCH ARTICLE

# Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats

Azalia Avila-Nava<sup>1</sup>, Lilia G. Noriega<sup>1</sup>, Armando R. Tovar<sup>1</sup>, Omar Granados<sup>1</sup>, Claudia Perez-Cruz<sup>3</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>2</sup> and Nimbe Torres<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología CINVESTAV-IPN, Mexico

**Scope:** There is few information about the possible health effects of a food combination based on a pre-hispanic Mexican diet (PMD). This diet rich in fiber, polyphenols, a healthy ratio of omega 6/omega 3 fatty acids, and vegetable protein could improve carbohydrate and lipid metabolism, gut microbiota and cognitive function.

**Methods and results:** We examined the effect of a PMD in a sucrose enriched high-fat model. The PMD contains corn, beans, tomato, nopal, chia and pumpkin seeds in dehydrated form. Following induction of obesity, rats were fed PMD. PMD consumption decreased glucose intolerance, body weight gain, serum and liver triglycerides and leptin. In addition, PMD decreased the size of the adipocytes, and increased the protein abundance of UCP-1, PPAR- $\alpha$ , PGC1- $\alpha$  and Tbx-1 in white adipose tissue. Finally, the PMD significant decreased hepatic levels of ROS, oxidized proteins and GSSG/GSH ratio and an increase in the relative abundance of *Bifidobacteria* and the improvement of cognitive function.

**Conclusion:** Consumption of a PMD decreased the glucose intolerance and the biochemical abnormalities caused by the obesity by increasing the abundance of proteins involved in fatty acid oxidation, decreasing the oxidative stress and modifying the gut microbiota.

## Keywords:

Gut microbiota / Oxidative stress / Pre-hispanic Mexican diet / Sucrose-enriched high-fat diet



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Received: December 11, 2015

Revised: June 10, 2016

Accepted: June 15, 2016

**Correspondence:** Nimbe Torres

**E-mail:** nimbester@gmail.com

**Abbreviations:** ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; AIN-93, control diet; AKT, protein kinase B; ALA,  $\alpha$ -linolenic; AUC, area under the curve; Cat, catalase; ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding protein; CPT1, carnitine palmitoyltransferase I; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FAS, fatty acid synthase; GIP, glucose-dependent insulintropic polypeptide; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; HDL, high-density lipoprotein; HFD+S, 5% sucrose-enriched high-fat diet; IL-6, interleukin 6; LDL, low-density lipoprotein; LPS, Lipopolysaccharide; MDA, malondialdehyde; ORAC, oxygen radi-

cal absorbance capacity; OS, oxidative stress; P-AKT, phosphorylated protein kinase B; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  coactivator; PMD, pre-hispanic Mexican diet; PPAR- $\alpha$ , peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ ; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ; RER, respiratory exchange ratio; ROS, reactive oxygen species; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein 1c; SOD1, superoxide dismutase 1; SOD2, superoxide dismutase 2; Tbx-1, T-box protein 1; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; UCP-1, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue; VCO<sub>2</sub>, volume carbon dioxide; VO<sub>2</sub>, volume oxygen



## 1 Introduction

Epidemiological studies have revealed important changes in food consumption in Mexico [1]. Acculturation often decreases the intake of native foods and increases the intake of refined foods, sweets and diets high in fat. Several investigators have demonstrated a correlational relationship between obesity, diabetes and acculturation [2, 3].

Emerging data support traditional foods that connect ethnicity to dietary intake patterns to promote healthy lifestyles [4]. Continued research is needed to provide evidence-based data to guide the recommendations for these foods.

The Mesoamerican pre-hispanic diet was based mainly on corn, black beans, nopal, chili, pumpkin and chia seeds [5], as well as turkey, fish, fowl and insects as sources of protein and minerals [6]. Such variety was not available to the entire population at all times. Indeed, the Spaniards were struck by the frugality of the everyday diet of the average Indian [7]. The average Indian ate a mostly vegetarian diet of corn, beans and seeds [7].

It has been widely reported that the combination of cereals and legumes complement the limiting amino acids in each source [8, 9] as in the case of black beans and corn, making this combination a good quality protein.

In the Aztec diet, there was almost no fat or oil, and the main sources of fat in the traditional diet were pumpkin and chia seeds rich in omega 3 fatty acids [10]. Omega 3 fatty acid contained in the chia seed downregulated the transcription factor SREBP-1c involved in fatty acid synthesis and its target gene FAS [11].

Nopal has been used for a long time in traditional Mexican cuisine and medicine. This vegetable contains soluble (mucilage and pectin) and insoluble fiber (cellulose, hemicellulose, lignin) and also contains  $\beta$ -carotenes, polyphenols and vitamin C with antioxidant activity [12]. Currently, nopal is commonly used as complementary and alternative medicine (CAM) in hispanic population [13] due to its anti-hyperglycemic effect in subjects with type 2 diabetes [14]. Obese animals fed nopal decreased the hepatic steatosis and oxidative stress by increasing adiponectin concentration that in turn up regulates PPAR- $\alpha$  involved in fatty acid oxidation [15].

Tomato contains fiber and vitamin C. Lycopene contained in tomato decrease plasma levels of resistin, leptin and interleukine-6 [16].

Currently, different countries are generating scientific evidence of beneficial effects of particular functional foods by the identification and understanding the potential mechanisms of biologically active components to prevent non-communicable diseases [17] such as obesity. However, there is no information that supports the beneficial effect of the pre-hispanic diet.

Thus, the consumption of a food combination of a typical pre-hispanic Mexican diet based on corn and bean proteins, nopal, tomato and chia and pumpkin seeds may modify the

lipid and carbohydrate metabolisms reducing the oxidative stress improving the functionality of the white adipose tissue and modify the gut microbiota in a diet-induced obesity model (to eliminate the physical activity factor).

## 2 Materials and methods

### 2.1 Reagents and materials

Fluorescein, 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride, Trolox, hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl, 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase and dinitrophenylhydrazine (DNPH) were purchased from Sigma-Aldrich. 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCD-HFDA) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The ELISA kits for insulin, adiponectin, and leptin were purchased from Alpcos (NH, USA), GIP (Raybiotech, Inc., GA, USA) and LPS (Cloud-Clone Corp. USA). The glucose meter was purchased from LifeScan, Inc., Milpitas, CA). Monoclonal antibodies against sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS), protein kinase B (AKT) and phosphorylated AKT, T-box protein 1 (Tbx-1) and peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), as well as  $\gamma$ -tubulin, were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-uncoupling protein 1 (UCP-1), anti-peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator (PGC1- $\alpha$ ) and anti-malondialdehyde (MDA) were obtained from ABCAM (ABCam, MA, USA). DNA isolation kit, RNAiso Plus for the extraction of total RNA and SYBR<sup>®</sup>, Premix Ex Taq<sup>™</sup>, miRNeasy Mini Kit and miScript miRNA PCR Kits were purchased from Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany).

### 2.2 Animals: housing and experimental design

Twenty-four male Sprague–Dawley rats from Harlan aged 5 to 7 weeks (120–150 g) were randomized for this study. The animals were housed in individual cages and maintained in a controlled temperature room with 12-h light–dark cycles and free access to water and food. The research protocol was developed in two stages. In the first stage, 18 rats were fed a high-fat diet and 5% sucrose in water (HFD+S), and 6 rats were fed a control diet (AIN-93) [18] for 6 months. In the second stage, the rats fed with HFD+S were changed to one of the following diets for 3 months: i) HFD+S ( $n = 6$ ), ii) AIN-93 ( $n = 6$ ), iii) PMD ( $n = 6$ ) (Supporting Information Fig. S1). The control group continued consuming the control diet ( $n = 6$ ). Animal weight and food consumption were determined every 3 days during the protocol. At the end of the study, we collected the stool of each rat and stored the samples at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. At the end of the experiment, the rats were killed by decapitation after being anesthetized with  $\text{CO}_2$ . The liver, adipose tissue and brain were rapidly removed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Samples of liver

**Table 1.** Composition of experimental diets (g/100g diet)

	Source	AIN-93	HFD	PMD
<b>Nutrient</b>				
Carbohydrate	Cornstarch	39.7	27.9	–
	Maltodextrin	13.3	6.3	–
	Sucrose	10	7.8	–
	Corn flour, black beans concentrate, nopal, tomato, chia and pumpkin seed	–	–	62
Protein	Casein	20	24	–
	Corn flour, black beans concentrate, nopal, chia and pumpkin seed	–	–	20
Lipid	Soy oil	7	7	–
	Lard	–	17	–
	Corn flour, black beans concentrate, nopal, chia and pumpkin seed	–	–	6
Fiber	Cellulose	5	5	–
	Corn flour, black beans concentrate, nopal, chia and pumpkin seed	–	–	8
Mineral	Mineral mix	3.5	3.5	3.5
Vitamin	Vitamin mix	1	1	1
	L-Cysteine	0.3	0.3	0.3
	Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
	TBHQ	0.0014	0.0014	0.0014
	Energy (Kcal/g)	3.9	5.1	3.8

and adipose tissues were collected and fixed in formalin for hematoxylin-and-eosin staining. Serum was obtained by centrifugation of blood at 1500 x g for 10 min and stored at –70°C until further analysis. The procedure was approved by the Animal Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, Mexico City (CINVA 277).

### 2.3 Dietary treatments

The composition of the AIN-93 diet (control), HFD and PMD is shown in Table 1. The diets were administered in dry form and the PMD was adjusted to the recommendation of the AIN-93 [18]. The PMD was based on the staple Mexican diet based on corn, beans and tomatoes [19] added of some traditional foods such as nopal, chia and pumpkin seeds. The HFD was prepared as described [20] with the addition of 5% of sucrose in the water.

### 2.4 Antioxidant activity of foods and identification of antioxidant compounds

The ORAC assay was performed according to a previous report [21] (For details see Supporting Information methods). The identification of antioxidants such as gallic acid, catechol, caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, quercetin and kaempferol was carried out by HPLC [22, 23]. The GSH and GSSG content in liver homogenates was obtained by spectrophotometric method [24] (For details see Supporting Information methods).

### 2.5 Quantification of Fatty Acids and fiber in diets

Total lipids from seeds and diets were extracted as described by Folch [25], and methylated as previously described [26]. The methylated fatty acids were analyzed by gas chromatography (Agilent 6850; Agilent, Santa Clara, CA, USA) with a flame ionization detector (Agilent), using an HP-1 capillary column (J&W Scientific, Albany, CA, USA). The content of total dietary fiber, soluble dietary fiber and insoluble dietary fiber were determined using the enzymatic-gravimetric AOAC method [27].

### 2.6 Biochemical variables

Serum glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL and HDL were analyzed with COBAS C11 (Roche). Serum insulin, adiponectin, leptin (Alpco Diagnostics), glucose insulinotropic peptide (Raybiotech, Inc.) and lipopolysaccharide (Cloud-Clone Corp.) were determined by ELISA kits (For details of LPS determination see Supporting Information methods).

### 2.7 Liver lipids and cholesterol

Liver lipids were extracted as previously described by Folch [25]. Cholesterol and triglycerides in the liver were measured with an enzymatic colorimetric commercial kit (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germany) in a chemistry analyzer (RAA-50; Technicon Ames, Tarrytown, NY, USA).

## 2.8 Glucose tolerance

At the end of the experiment, a glucose tolerance test was performed by the intraperitoneal injection of a glucose load of 2 g per kg body weight in 8 h fasted rats. Blood samples were collected from the tail vein at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after administration of the glucose load. The plasma glucose concentration was measured using an OneTouch Ultra Glucose Meter (LifeScan, Inc., Milpitas, CA).

## 2.9 Measurement of energy expenditure

Energy expenditure was measured by indirect calorimetry in an Oxymax Lab Animal Monitoring (CLAMS) System (Columbus Instruments, Columbus OH). The animals were individually housed for 48 h in plexiglass cages with an open flow system connected to CLAMS. The animals were acclimatized for 24 h, fasted for 12 h during the light period and fed during the dark period. Throughout the test, O<sub>2</sub> consumption (VO<sub>2</sub> mL/Kg/h) and CO<sub>2</sub> production (VCO<sub>2</sub>, mL/Kg/h) were measured sequentially for 90 s. The respiratory exchange ratio (RER) was calculated as the average ratio of VCO<sub>2</sub> produced to VO<sub>2</sub> inhaled (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>).

## 2.10 Histological analysis

A morphologic analysis of tissues was performed using the Leica Qwin image-analyzer system on a Leica DMLS microscope. Liver and white adipose tissue was fixed with 4% paraformaldehyde. Sections of 5 μm thick liver and adipose tissues were stained with hematoxylin and eosin. The adipocyte area was measured with the ImageJ 1.42p digital imaging processing software.

## 2.11 Determination of oxidative markers

Reactive oxygen species (ROS) production [28], lipid peroxidation [29] and oxidation of protein [30] were measured in homogenates from tissues [31] (For details see Supporting Information methods).

## 2.12 Western-blotting analysis

Total protein of pooled liver and adipose tissue samples ( $n = 6$ ) was extracted and quantified by the Bradford assay (Bio-Rad) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  (For details see Supporting Information methods). The protein detection was performed by SDS-PAGE and then transferred to a membrane and incubated with primary and secondary antibodies to obtain the immunoblotting image with a ChemiDoc™ XRS + System Image Lab™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA) as previously described [32] (For details see Supporting information methods). The immunoblotting assays were performed 3 times using independent blots.

## 2.13 Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIzol, following the manufacturer's instructions. The mRNA abundance was measured by real-time quantitative PCR using Taqman assays (Applied Biosystems) and the SYBR® Premix assay (Roche), using actin as a reference for normalization. The primers are listed in the Supporting Information Table S5.

## 2.14 miRNA extraction

Extracellular microRNA from the white adipose tissue was isolated using miRNeasy Mini Kit (Qiagen) reagents. cDNA was prepared using the miScript II RT Kit, used as a template in real-time PCR with miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen); RNU6-2 was employed as a reference for normalization. The primers are listed in the Supporting Information Table S5.

## 2.15 Microbiota analysis by real time PCR

Stool DNA was isolated using DNA isolation Kit (Qiagen) reagents. The DNA abundance was measured by real-time quantitative PCR, using SYBR® Premix assay (Roche), employing a universal primer (16S gene) as a reference for normalization. The primers are listed in the Supporting Information Table S5.

## 2.16 Memory evaluation by T-maze

Five days before finalizing all dietary interventions, the memory was evaluated by T-maze spontaneous alternation blots [33] (For details see Supporting Information methods).

## 2.17 Statistics

The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using an unpaired *t*-test compared with control group, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test was used to compare among all groups, using software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA),  $p < 0.05$  was considered significant.

# 3 Results

## 3.1 Antioxidant activity, antioxidant compounds and fatty acid composition in the PMD

To assess the antioxidant activity of the individual components of the PMD, the ORAC assay was performed. The results showed that the main components of the PMD had antioxidant activity and that nopal had the highest activity ( $8737 \pm 1037$  Trolox equivalents μmoles/g) (Supporting

**Table 2.** Effect of a high-fat diet enriched with 5% sucrose in water for 6 months (stage 1) and dietary intervention with different types of diet for 3 months (stage 2) on body weight, food consumption, energy intake, serum biochemical parameters and liver lipids

Parameter	Diet-induced obesity (stage 1)		Diet intervention (stage 2)			
	AIN-93	HFD+S	AIN 93→AIN-93	HFD+S→HFD+S	HFD+S→AIN-93	HFD+S→PMD
Weight (g)	467 ± 9.7	538.4 ± 9.7**	477 ± 13.4 <sup>c</sup>	574.3 ± 8.7 <sup>a</sup>	560.8 ± 17.2 <sup>a</sup>	500.5 ± 12.8 <sup>b</sup>
Food consumption (Kcal/day)	58.7 ± 3.4	71.4 ± 1.9*	67.7 ± 3.35	78.5 ± 12.2	72.3 ± 2.49	70.4 ± 5.29
<b>Serum</b>						
Insulin (ng/mL)	0.98 ± 0.1	2.86 ± 0.2	0.99 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.43 ± 0.216 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.27 <sup>a</sup>
Glucose (mg/mL)	108 ± 1.05	116 ± 0.98**	112 ± 4.43 <sup>a,b</sup>	124 ± 2.34 <sup>a</sup>	103 ± 5.43 <sup>a,b</sup>	90.6 ± 2 <sup>c</sup>
Triglycerides (mg/mL)	112 ± 9.71	173 ± 10.8**	109 ± 19.8 <sup>b</sup>	151 ± 12.1 <sup>a</sup>	106 ± 15.9 <sup>a,b</sup>	92.9 ± 12.2 <sup>c</sup>
Cholesterol (mg/mL)	106 ± 7.89	135 ± 4.33**	104.1 ± 4.26 <sup>b</sup>	137.3 ± 9.24 <sup>a</sup>	112.6 ± 2.98 <sup>b</sup>	106 ± 5.03 <sup>b</sup>
LDL (mg/mL)	19.3 ± 1.82	25.5 ± 1.61*	25.9 ± 1.39 <sup>b</sup>	33.5 ± 1.89 <sup>a</sup>	27.6 ± 1.51 <sup>b</sup>	28.4 ± 0.88 <sup>b</sup>
HDL (mg/mL)	83.9 ± 5.23	93.9 ± 3.45	71.5 ± 3.1 <sup>b</sup>	94.2 ± 6.72 <sup>a</sup>	77.4 ± 2.74 <sup>b</sup>	80.4 ± 4.60 <sup>b</sup>
Adiponectin (μg/mL)	–	–	16.5 ± 1.42 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.15 <sup>b</sup>	13.3 ± 1.33 <sup>b</sup>	16.7 ± 1.66 <sup>a</sup>
Leptin (ng/mL)	–	–	2.7 ± 1.3 <sup>c</sup>	6.7 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.6 ± 0.04 <sup>d</sup>
<b>Liver</b>						
Triglycerides (mg/g of tissue)	–	–	9.22 ± 0.33 <sup>b,c</sup>	11.1 ± 0.99 <sup>a</sup>	9.83 ± 0.44 <sup>b</sup>	7.73 ± 0.34 <sup>c</sup>
Cholesterol (mg/g of tissue)	–	–	3.63 ± 0.06	4.03 ± 0.05	3.57 ± 0.04	3.47 ± 0.06

Data are expressed as the mean ± SEM ( $n = 5$ ). The data of the first stage were analyzed by an unpaired *t*-test vs. control group and the differences were considered statistically significant at \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . In the second stage, statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

Information Fig. S2A). Taken together, these results indicated that the PMD had ten times higher antioxidant activity than the control AIN-93 and HFD diets,  $p < 0.001$  (Supporting Information Fig. S2B). The antioxidant compounds identified in the PMD were catechol, caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, quercetin and kaempferol (Supporting Information Table S3).

In addition, we identified the fatty acid profile in chia and pumpkin seeds. Interestingly, the pumpkin seed contained small amounts of docosahexaenoic acid (DHA, 20:6), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5), oleic acid (18:1), palmitic acid and stearic acid (Supporting Information Table S1). Chia seed contained mainly  $\alpha$ -linolenic (ALA, 18:3) and linoleic acid (18:2), as well as small amounts of oleic (18:1) palmitic (16:0) and stearic (18:0) acids (Supporting Information Table S1). In addition, we identified the fatty acid profile present in the experimental diets. Interestingly, PMD contained lower omega-6/omega-3 ratio (2:1) compared with AIN-93 (6:1) and HFD (8:1) that was confirmed by the gas chromatography analysis (Supporting Information Table S2).

### 3.2 PMD consumption decreases body weight gain and reduces biochemical abnormalities produced by obesity

After 9 months of dietary treatment, the HFD+S group showed 13.7% higher body weight gain than the control group

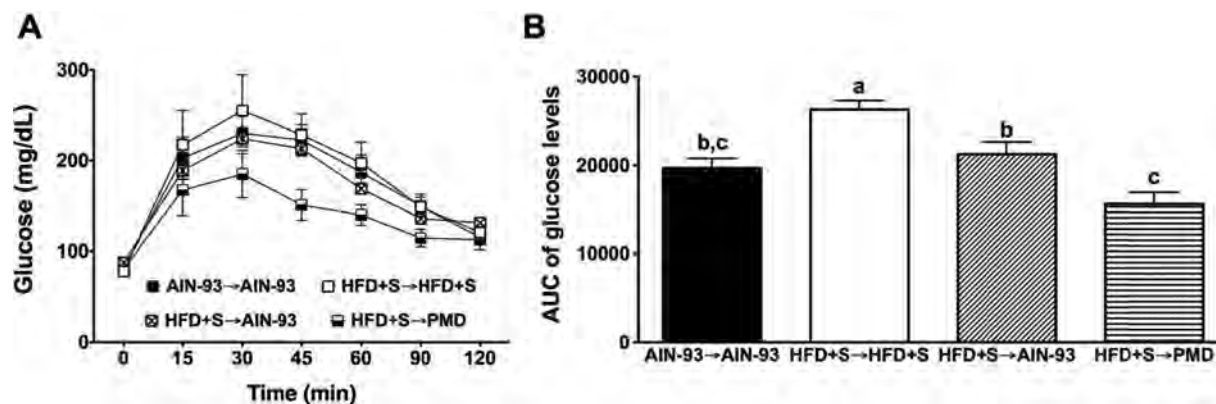
( $p < 0.001$ ) (see Table 2). Thus, the HFD+S group had higher serum glucose, triglycerides, total cholesterol and LDL concentrations than the control group ( $p < 0.05$ ) (see Table 2).

When the HFD+S group was switched for 3 months to a dietary intervention consuming the PMD diet, there was a significant decrease in body weight gain ( $p < 0.05$ ), as well as in all biochemical variables compared with rats that continued the HFD+S diet (Table 2), whereas there was no significant difference in body weight gain between the HFD+S and AIN-93 groups after 3 months of dietary treatment (Table 2). Interestingly, the hormonal parameters were also modified after 3 months of the dietary intervention. PMD and AIN-93 significantly reduced the insulin and leptin concentrations and increased the adiponectin concentration, compared with those of the HFD+S group (Table 2).

### 3.3 PMD reduces glucose intolerance and metabolic inflexibility

After 9 months of consumption of the HFD+S, the AUC for glucose was significantly higher than the control group (Fig. 1A and B). Interestingly, after 3 months of dietary intervention, the AUC of the PMD group was even lower than that obtained for the control group ( $p < 0.01$ , Fig. 1B).

In addition, the metabolic improvement of the obese rats after 3 month with PMD was accompanied by an increase in  $VO_2$  similar to that observed in the control group, as



**Figure 1.** Glucose tolerance test (A) and area under the curve (B) after the consumption of different types of diets. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

measured during the indirect calorimetry analysis (Fig. 2C and D). Furthermore, the assessment of the respiratory exchange ratio (RER) showed that after 9 month of consumption of HFD+S, this group had a lower RER ( $0.85 \pm 0.003$ ) than the control group did ( $0.90 \pm 0.002$ ), indicating that the utilization of lipids as an energy substrate was 49.3% in the HFD+S group compared with 32.5% in the control group, suggesting a metabolic inflexibility. Interestingly, obese rats after 3 month with the PMD diet exhibited a significant increase in the RER ( $0.91 \pm 0.002$ ; 29.2% of fat as an energy source) on the re-fed condition (night) compared with HFD+S group, increasing up to 70.8% carbohydrate oxidation as energy source (Fig. 2A and B).

#### 3.4 Consumption of PMD reduces oxidative stress and liver damage

After 9 month of dietary treatment with HFD+S, rats showed the presence of small lipid droplets in the liver; by contrast, the intervention of obese rats with PMD for 3 months significantly reduced the hepatic damage as the liver structure and architecture was similar to the control group (Fig. 3A). This improvement was associated with a marked reduction in the liver triglyceride content of the PMD group compared with the HFD+S group ( $p < 0.05$ ) (Table 2). During obesity, there is excess in the formation of ROS that promote the oxidation of lipids and proteins. In fact, rats fed for 9 months with the HFD+S diet had a significant increase in ROS, MDA and MDA protein-adducts (Fig. 3B, C, and E), oxidized proteins measured by protein carbonyl and GSSG/GSH ratio (%) (Fig. 4A and D), compared with those fed the control diet. Obese rats fed with the PMD or AIN-93 diets had significantly lower ROS and MDA levels (Fig. 3B and C), MDA-protein adducts (Fig. 3E) and oxidized proteins levels (Fig. 4A) than the HFD+S group (Fig. 3B–D), interestingly, the PMD group

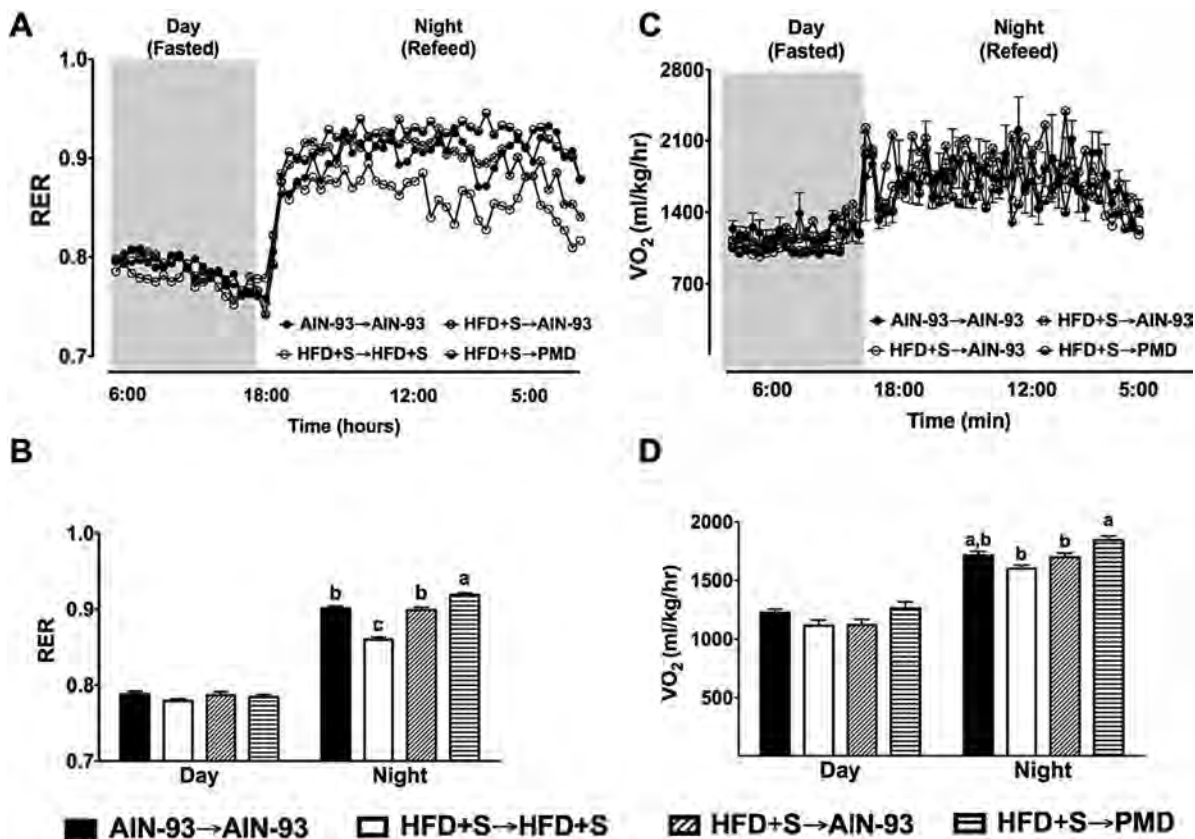
showed the lowest ROS formation (Fig. 3B), oxidized proteins and GSSG/GSH ratio (%) (Fig. 4D).

#### 3.5 PMD has an impact on hepatic gene and protein expression

We examined whether the hepatic lipid levels were associated with changes in the expression of lipogenic and fatty oxidation genes. As expected, after the consumption of HFD+S, there was an increase in the expression of genes and proteins involved in lipogenesis (*SREBP-1c*, *ChREBP* and *FAS*) (Fig. 3D and E). (For quantitative analysis, see Supporting information, Fig. S3) and a decrease in the expression of genes related to fatty oxidation (*PPAR- $\alpha$* ), compared with the control group (Fig. 3D). This was accompanied by an increase in the expression of genes responsible for inflammation (*IL-6* and *TNF- $\alpha$* ). After the consumption of PMD, there was a significant decrease in lipogenesis and inflammation and an increase in the antioxidant enzyme catalase in the groups fed control or PMD (Fig. 3D). Additionally, there was improved insulin signaling mediated by the phosphorylation of AKT (Fig. 3E) in the control and in the PMD groups (Fig. 3E). (For quantitative analysis, see Supporting information, Fig. S3)

#### 3.6 Consumption of PMD decreases adipocyte size and increases the functionality of white adipose tissue (WAT)

Improvement in the accumulation of hepatic lipids has been associated with functional adipose tissue. In fact, after the consumption of HFD+S, the obese rats exhibited an increase in the size and number of adipocytes (Fig. 5A–D), indicative of hypertrophic adipose tissue. After the consumption of PMD, there was a decrease in the size of adipocytes (Fig. 5A and B) and in their triglyceride content (Fig. 5D). The HFD+S group had a concomitantly higher mRNA abun-



**Figure 2.** Energy expenditure (A) and oxygen consumption ( $VO_2$ ) in rats fed control diet (AIN 93) or HFD after 6 months (first stage) and after the dietary treatments for 3 months (second stage). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

dance of *ChREBP* and, after the intervention with PMD, significantly decreased both *ChREBP* and *SREBP-1c* expression to levels similar to those of the control group (Fig. 5E). In addition, the HFD+S group showed a decrease in *adiponectin* expression in WAT ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5E), but the intervention with PMD increased the gene expression of *adiponectin* (Fig. 5E).

### 3.7 PMD consumption induced thermogenesis in white adipose tissue

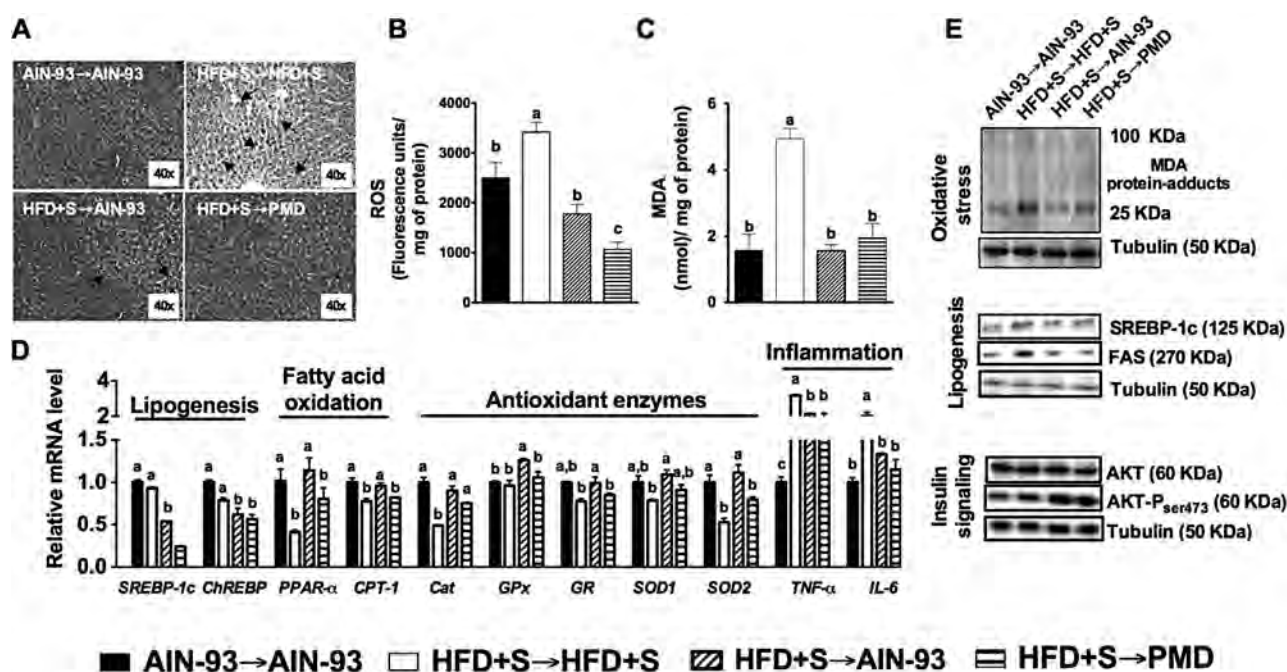
Additionally, we evaluated whether PMD could induce the thermogenesis process in WAT by analyzing the expression of specific proteins such as uncoupling protein 1 (UCP-1), T-box protein 1 (Tbx-1), peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  coactivator (PGC1- $\alpha$ ). Interestingly, the PMD group increased the protein expression of Tbx-1, PPAR- $\alpha$  and PGC1- $\alpha$  proteins in WAT, compared with the HFD+S and AIN-93 groups (Fig. 5F), explaining in part the increase in oxygen consumption ( $VO_2$ ). (For quantitative analysis, see Supporting Information, Fig. S3).

### 3.8 Regulation of the miR-27b expression by PMD

To assess whether changes in WAT by the dietary treatments could be associated with the expression of miRNA, we measured the expression of miR-27b. Interestingly, obese rats fed the PMD increased miR-27b gene expression in WAT (Fig. 5G), associated with a decrease in PPAR- $\gamma$  expression in greater extent than obese animals fed AIN-93 (Fig. 5H and I). On the contrary, the consumption of HFD+S decreased miR-27b and increased PPAR- $\gamma$  gene and protein expression (Fig. 5G–I). (For quantitative analysis see Supporting Information Fig. S3).

### 3.9 Microbiota was modulated by PMD

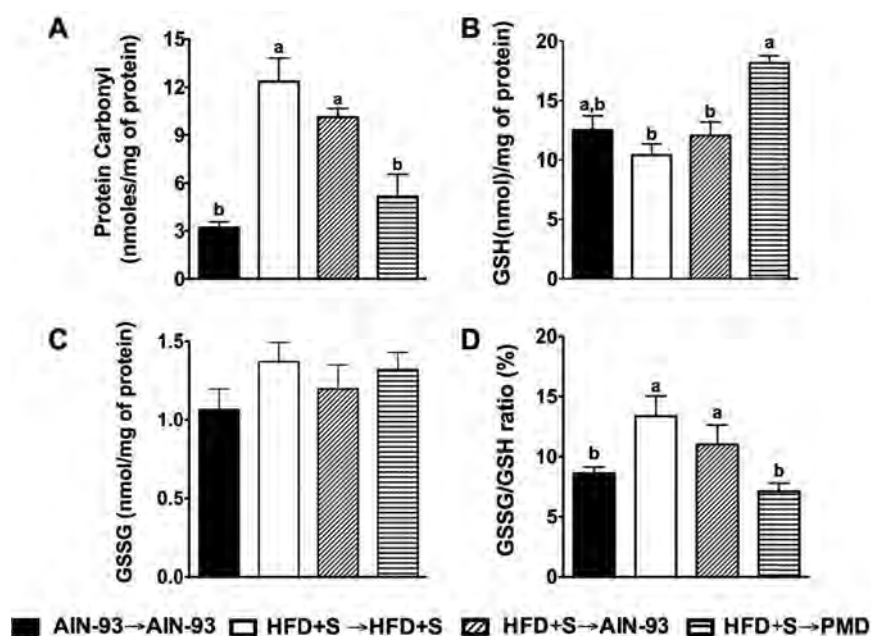
Diet can have a major influence on microbial community composition, however, little is known about the possible effect of a combination of foods based on a pre-hispanic diet that are still consumed. The development of obesity is influenced by relative proportion of the two major phyla of bacteria (*Firmicutes* and *Bacteroidetes*) present in the gut. In this study, after 9 months of consumption of HFD+S there was a 23%



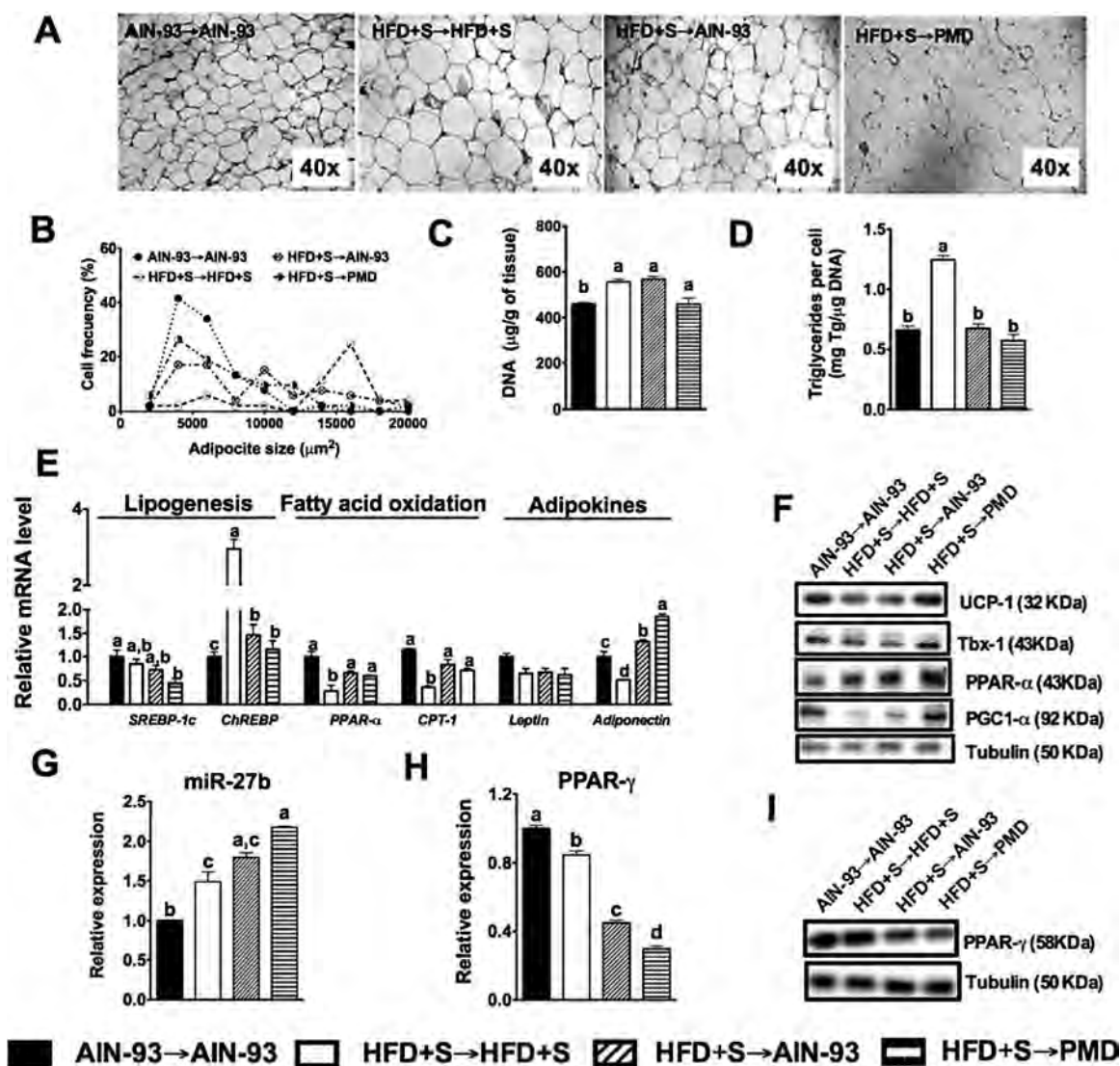
**Figure 3.** Hepatic hematoxylin and eosin histological analysis (A), reactive oxygen species (ROS) (B), malondialdehyde (MDA) concentration (C) Hepatic expression of genes involved in lipogenesis, fatty acid oxidation, antioxidant and inflammation in the liver (D), protein abundance of MDA protein-adducts, SREBP-1c, FAS, AKT and AKT-P in the liver, with tubulin used as the loading control (E) of rats fed the dietary treatments for 3 months (second stage). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

increase in *Firmicutes* and a 36% decrease in *Bacteroidetes* abundances, compared with the control group. After the dietary intervention with PMD, the *Firmicutes* significantly decreased by 68% and the abundance of *Bacteroidetes* increased

by 32%, compared with the HFD+S group (Fig. 6A); a similar change in microbiota was observed with the AIN-93 group. Interestingly, in HFD+S group, there was a 32% decrease in *Bifidobacteria* compared with the control group, whereas the



**Figure 4.** Antioxidant status in liver determined by (A) oxidized protein, (B) GSH, (C) GSSG and (D) GSSG/GSH ratio (%) content in rats fed different types of diets. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .



**Figure 5.** White adipose tissue hematoxylin and eosin histological analysis (A) Adipocyte distribution size (B), adipose tissue DNA content (C) and adipose tissue triglyceride/DNA ratio (D), Expression of genes involved in lipogenesis, fatty acid oxidation and adipokines in white adipose tissue (E), protein abundance of UCP-1, Tbx-1, PPAR- $\alpha$  and PGC1- $\alpha$  in WAT, with tubulin as the loading control (F), miR-27b abundance (G), PPAR- $\gamma$  mRNA (H) and protein (I) abundance in WAT of rats fed the dietary treatments for 3 months (second stage). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

PMD group showed the highest increase in the abundance of *Bifidobacteria* by 64%, compared with the HFD+S group. Additionally, PMD increased the abundance of *Lactobacillus* by 21%, compared with the HFD+S group, to a similar extent than the AIN-93 group (Fig. 6A).

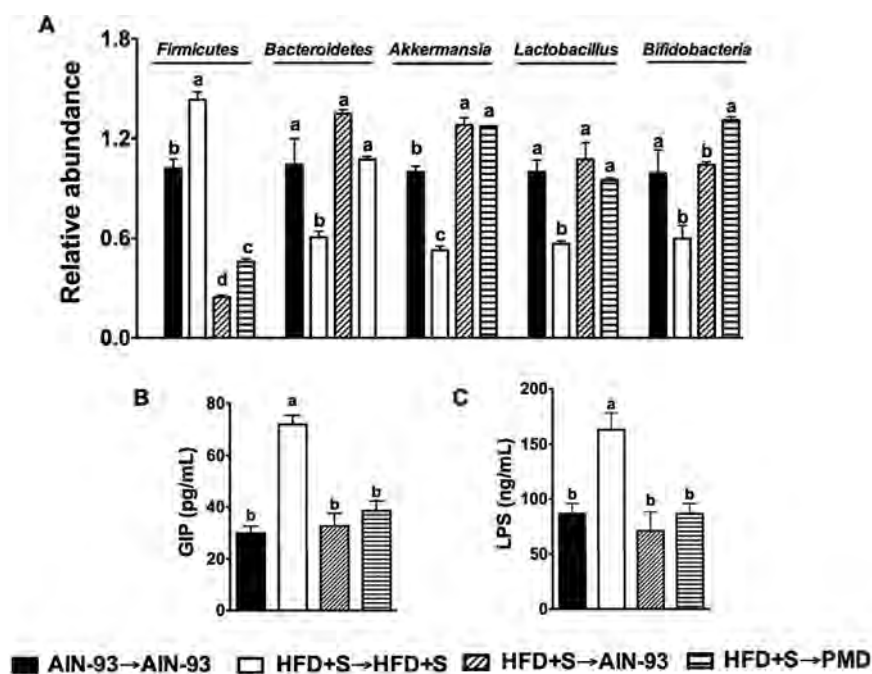
Furthermore, the consumption of a HFD+S stimulated the production of lipopolysaccharide (LPS) and the incretin glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) that regulates insulin secretion. In fact, the HFD+S group showed 2.4-fold increase in GIP and 1.9-fold increase in LPS concentration compared with the control group. The dietary

treatment with PMD or AIN-93 diets significantly produced a reduction of GIP and LPS to the normal values (Fig. 6B and C).

### 3.10 PMD improved cognitive function and decreased oxidative stress in the brain

We also investigated whether the PMD diet could improve the lipoperoxidation state, not only in WAT but also in the brain, which could accelerate the cognitive decline produced





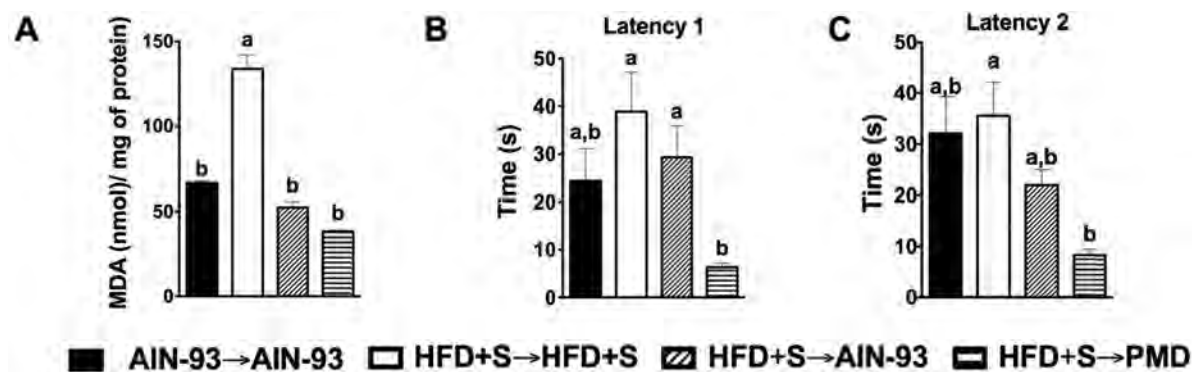
**Figure 6.** Relative abundance of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Akkermansia*, *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* were determined by PCR in stool samples (A), serum LPS concentration (B) and GIP levels after the dietary treatments for 3 months (second stage). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

by oxidative stress during obesity. Surprisingly, in rats fed for 9 months with HFD+S, there was an increase of approximately 100% in the brain MDA concentration, compared with the control group. The consumption of PMD for 3 months of intervention decreased the MDA concentration, similar to that observed in the control or AIN-93 groups (Fig. 7A). The results in the present study indicated that the HFD+S group exhibited spatial long- and short-term memory performance impairments reflected in the latency times 1 and 2 (Fig. 7B and C), whereas the intervention for 3 months with PMD had a strong effect on the improvement of memory observed in the lowest latency times (Fig. 7B and C).

## 4 Discussion

Acculturation often decreases the intake of native foods and increases the intake of refined foods, sweets and diets high in fat. These dietary changes have led in an increase in the prevalence of obesity in the hispanic population [2]. Emerging data support traditional foods to promote healthy lifestyles, however there is not much information about the pre-hispanic diet on health effects.

The consumption of a sucrose-enriched high-fat diet for several months promotes several biochemical alterations as well as a metabolic inflexibility due to an increased flux of



**Figure 7.** Brain MDA concentrations (A), T-maze test to evaluate spatial memory, Latency 1 (B), Latency 2 (C) after the dietary treatments for 3 months (second stage). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Differences among groups are indicated by letters, where  $a > b > c$ .

nutrients to the mitochondria leading in a metabolic congestion [34], oxidative stress, dysbiosis in the microbiota and possible cognitive damage. It would expect that changes in the diet by one more balanced could improve biochemical parameters, reducing metabolic abnormalities. Interestingly, the consumption of the PMD which contains an adequate combination of vegetable proteins from legumes and cereals, low unsaturated fat [10], high in fiber (Supporting Information Table S4) improved specific physiological parameters associated with a reduction of body weight such as serum glucose, glucose intolerance and serum triglycerides. This in turn increased proteins involved in fatty acid oxidation such as PPAR- $\alpha$ , UCP-1, Tbx-1 and the coactivator PGC1- $\alpha$ . Increase in PGC1- $\alpha$ , indicate a better function of the mitochondria, which can be reflected in an increased energy expenditure [35]. As a consequence, we observed in a PMD group a decrease in adipocyte size and liver triglycerides and leptin concentrations leading in a higher weight lost. These results suggest that the consumption of the PMD increase the thermogenic capacity of the adipose tissue possibly in part due to a browning process. These results are in agreement with previous studies that have demonstrated that consumption of certain polyphenols including quercetin lead to white adipose tissue browning [36]. In fact, the antioxidant compounds found in the PMD includes the polyphenols quercetin, kaempferol, and catechol. Interestingly, the results of the present study revealed that the antioxidant activity of the pre-hispanic Mexican diet was 10 times higher than the control or high-fat diets. On the other hand, our data indicates that consumption of PMD decreased metabolic inflexibility which in turn decreased the oxidative stress markers such as ROS, oxidized proteins and GSSG/GSH ratio and had a significant impact on cognitive function, improving the spatial memory. Thus, improvement in metabolic flexibility in addition to the high antioxidant activity in the PMD substantially reduces the formation of ROS and this is associated with an improvement of insulin sensitivity [37]. In addition, nutrients and bioactive compounds in the diet can regulate signaling pathways, transcription factors and other potential regulators, such as microRNA (miRNA) in WAT, which are involved in the regulation of gene expression. Previous studies have shown that nutrient supplementation with polyphenols and PUFAs can modulate miRNA expression in adipose tissue [38]. The consumption of the PMD diet that contains PUFAs and polyphenols stimulated miRNA-27b expression by binding to the 3' UTR promoter region of PPAR- $\gamma$ , which represses adipogenic process. These results may also explain why the obese rats fed the PMD displayed more weight lost.

The differences between PMD and AIN-93 groups could be partly explained by the different diet content. Compared to AIN-93, PMD diet does not contain sucrose which was shown in many studies to be a positively associated with obesity, insulin resistance and fatty liver [39]. In addition, in the Aztec diet, the main sources of fat were pumpkin seeds, which contain mainly oleic acid, small amounts of DHA, EPA, and low saturated fat that contains less steric

acid which is implicated in the development of liver steatosis. Chia seeds are rich in omega 3 fatty acids and oleic acid, which provide an omega-6 to omega-3 ratio of 2:1. The current ratio in the Western diet increased from 3:1 to 15:1 [40, 41], indicating a diet deficient in omega-3 fatty acids and excessive amounts of omega-6 fatty acids, compared with the diet on which human beings evolved and their genetic patterns were established. There is evidence that polyunsaturated fatty acids are natural ligands of PPAR- $\alpha$  that activate the expression of genes involved in fatty acid oxidation [11].

However, not only is the interaction between various organs and cell systems involved in the development of obesity but there is also increasing evidence that the gut microbiota contributes to the pathophysiology of obesity. The modulation of gut peptides involved in the control of glucose homeostasis may be one mechanism by which the modulation of gut microbiota via specific dietary fiber is associated with an improvement of metabolic disorders. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and metabolic syndrome. Some constituents of PMD, such as dehydrated nopal, chia and pumpkin seeds, are excellent sources of soluble and insoluble fiber that can function as prebiotics. Nopal contains mucilage, which is composed of arabinoxylans [42] that are considered prebiotics [43, 44]. To obtain a more accurate analysis of the gut microbiota, we analyzed some microbial community profiles of obese rats with or without PMD. Consistent with previous research [45], we observed a significant increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio during the obesity, and this ratio was inverted during the dietary intervention with PMD. Prebiotic consumption has been associated with increases of *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* and *Akkermansia* [46]. Our results showed that PMD consumption significantly increased *Bifidobacteria* in a higher extent than the control diet, indicating that PMD may contain some foods with prebiotic effects.

In summary, our findings suggest that PMD, low in saturated fat, with an adequate omega 6/omega 3 ratio and high in soluble and insoluble fiber and antioxidants can reverse some of the metabolic abnormalities related with obesity. Furthermore, our results support the consumption of foods present in the PMD as a part of dietary strategies to ameliorate the metabolic abnormalities observed during obesity.

*NT and AT designed the study; AAN and CPC performed the study; AAN, LGN, OG, CPC and JPC performed some specific analysis analyzed the data; AAN, NT and AT wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Flores, M., Macias, N., Rivera, M., Lozada, A. et al., Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight or obese. *J. Nutr.* 2010, *140*, 1869–1873.
- [2] Rivera, J. A., Barquera, S., Campirano, F., Campos, I. et al., Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid

- increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr.* 2002, 5, 113–122.
- [3] Garcia, L., Gold, E. B., Wang, L., Yang, X. et al., The relation of acculturation to overweight, obesity, pre-diabetes and diabetes among U.S. Mexican-American women and men. *Ethn. Dis.* 2012, 22, 58–64.
- [4] Bilyk, H. T., Role of registered dietitian nutritionists in the research and promotion of native and cultural foods. *J. Acad. Nutr. Diet* 2014, 114, 1736–1738.
- [5] Iturriaga, J. (Ed.), *Las cocinas de México I*, Fondo de Cultura Económica, Mexico 2000.
- [6] Ramos-Elorduy, J. (Ed.), *Los insectos como fuente de una proteínas en el futuro*, Limusa, Mexico 1982.
- [7] Laudan, R., in: Fink, B. (Ed.), *Glancing Backward to Spain or Looking Forward to Mexico?*, Eighteenth-Century Life, Duke University Press 1999, pp. 59–70.
- [8] Mensa-Wilmont, Y., Phillips, R. D., Hargrove, J. L., Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutr. Res.* 2001, 21, 849–857.
- [9] Scrimshaw, N. S., Bressani, R., Behar, M., Viteri, F., Supplementation of cereal proteins with amino acids. I. Effect of amino acid supplementation of corn-masa at high levels of protein intake on the nitrogen retention of young children. *J. Nutr.* 1958, 66, 485–499.
- [10] Kittler, P. G., Sucher, K. P., Nelms, M. N., *Food and Culture*, Wadsworth CENGAGE Learning, USA 2012.
- [11] Tovar, A. R., Diaz-Villasenor, A., Cruz-Salazar, N., Ordaz, G. et al., Dietary type and amount of fat modulate lipid metabolism gene expression in liver and in adipose tissue in high-fat diet-fed rats. *Arc. Med. Res.* 2011, 42, 540–553.
- [12] Stintzing, F. C., Carle, R., Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 175–194.
- [13] Villa-Caballero, L., Morello, C. M., Chynoweth, M. E., Prieto-Rosinol, A. et al., Ethnic differences in complementary and alternative medicine use among patients with diabetes. *Complement. Ther. Med.* 2010, 18, 241–248.
- [14] Lopez-Romero, P., Pichardo-Ontiveros, E., Avila-Nava, A., Vazquez-Manjarrez, N. et al., The effect of nopal (*Opuntia ficus indica*) on postprandial blood glucose, incretins, and antioxidant activity in Mexican patients with type 2 diabetes after consumption of two different composition breakfasts. *J. Acad. Nutr. Diet* 2014, 114, 1811–1818.
- [15] Moran-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J. et al., *Opuntia ficus indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Nutr.* 2012, 142, 1956–1963.
- [16] Luvizotto Rde, A., Nascimento, A. F., Imaizumi, E., Pierine, D. T. et al., Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* 2013, 110, 1803–1809.
- [17] Siro, I., Kopolna, E., Kopolna, B., Lugasi, A., Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite* 2008, 51, 456–467.
- [18] Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C., Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993, 123, 1939–1951.
- [19] Goyan Kittler, P., Sucher, K. P., *Food and Culture*, Wadsworth, Cengage Learning, Boston, MA, USA 2012.
- [20] Rodriguez-Rodriguez, C., Torres, N., Gutierrez-Urbe, J. A., Noriega, L. G. et al., The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food Function* 2015, 6, 805–815.
- [21] Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4437–4444.
- [22] Reyes-Caudillo, E. T. A., Valdivia-López, M.A., Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chem.* 2008, 107, 656–663.
- [23] Tsao, R., Yang, R., Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2003, 1018, 29–40.
- [24] Rahman, I., Kode, A., Biswas, S. K., Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 3159–3165.
- [25] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497–509.
- [26] Barakat, H. A., Dohm, G. L., Loesche, P., Tapscott, E. B. et al., Lipid content and fatty acid composition of heart and muscle of the BIO 82.62 cardiomyopathic hamster. *Lipids* 1976, 11, 747–751.
- [27] Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W. et al., Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1988, 71, 1017–1023.
- [28] Ali, S. F., LeBel, C. P., Bondy, S. C., Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992, 13, 637–648.
- [29] Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N. et al., Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 1176–1183.
- [30] Reznick, A. Z., Packer, L., Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994, 233, 357–363.
- [31] Molina-Jijon, E., Rodriguez-Munoz, R., Namorado Mdel, C., Pedraza-Chaverri, J. et al., Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 72, 162–175.
- [32] Velazquez-Villegas, L. A., Tovar, A. R., Lopez-Barradas, A. M., Torres, N., The dietary protein/carbohydrate ratio differentially modifies lipogenesis and protein synthesis in the mammary gland, liver and adipose tissue during gestation and lactation. *PLoS One* 2013, 8, e69338.

- [33] Deacon, R. M., Rawlins, J. N., T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 7–12.
- [34] Muoio, D. M., Metabolic inflexibility: when mitochondrial decision leads to metabolic gridlock. *Cell* 2014, 159, 1253–1262.
- [35] Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C. et al., FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012, 26, 271–281.
- [36] Moon, J., Do, H. J., Kim, O. Y., Shin, M. J., Antiobesity effects of quercetin-rich onion peel extract on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and the adipogenesis in high fat-fed rats. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 58, 347–354.
- [37] Jimenez-Gomez, Y., Mattison, J. A., Pearson, K. J., Martin-Montalvo, A. et al., Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab.* 2013, 18, 533–545.
- [38] Baselga-Escudero, L., Blade, C., Ribas-Latre, A., Casanova, E. et al., Chronic supplementation of proanthocyanidins reduces postprandial lipemia and liver miR-33a and miR-122 levels in a dose-dependent manner in healthy rats. *J. Nutr. Biochem.* 2014, 25, 151–156.
- [39] Lima, M. L., Leite, L. H., Gioda, C. R., Leme, F. O. et al., A novel Wistar Rat model of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease induced by sucrose-rich diet. *J. Diabetes Res.* 2016, 2016, 9127076.
- [40] Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P. et al., Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog. Lipid Res.* 2006, 45, 203–236.
- [41] Simopoulos, A. P., Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biol. Res.* 2004, 37, 263–277.
- [42] Olivares-Perez A, T.-L. S., Padilla-Velasco Ana, L., Nopal Cactus (*Opuntia Ficus-Indica*) as a holographic material. *Materials* 2012, 5, 2383–2402.
- [43] Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Backhed, F., Cani, P. D., Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011, 7, 639–646.
- [44] Cluny, N. L., Eller, L. K., Keenan, C. M., Reimer, R. A. et al., Interactive effects of oligofructose and obesity predisposition on gut hormones and microbiota in diet-induced obese rats. *Obesity (Silver Spring)* 2015, 23, 769–778.
- [45] Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A. et al., Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005, 102, 11070–11075.
- [46] Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M. et al., Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 2011, 60, 2775–2786.