



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Evaluación de la expresión de *TLR-4*, *IL-1 β* y *COX-2* y producción de especies reactivas de oxígeno en conejos *Oryctolagus cuniculus* alimentados con una dieta alta en grasa”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA :

ORTIZ REYES ANA ELENKA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Claudia Marissa Calderón Torres

COMITÉ REVISOR:

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez

Dra. Ana María García Bores

Dr. Miguel Murguía Romero

M. en C. Llaraí Carolina Gaviria González



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, maestra y amiga, la Dra. Claudia Marissa Calderón Torres, por compartir conmigo esta experiencia dentro de la investigación científica, por el conocimiento transmitido, por su apoyo en este trabajo de tesis y por participar en mi formación como profesionista, pero sobre todo por su confianza y ayuda en los buenos y malos momentos.

Quiero agradecer el gran apoyo incondicional del Dr. Antonio Peña Díaz, por recibirme en el laboratorio y por todo lo que hizo por mí y mi trabajo de tesis, por su amabilidad, y por ser una persona que se preocupa y ayuda a los alumnos. Ojalá existan más investigadores como usted. Así como también agradecimientos a las maestras del laboratorio 306 de IFC: la Dra. Martha Calahorra y a la M. en C. Norma Sánchez quienes me ayudaron cuando lo necesite y me recibieron amablemente en el laboratorio. Gracias también a la M. en C. Minerva por ayudarme en todo y los buenas pláticas y risas que compartimos, mientras esperaba el termociclador. También gracias a Karina Estrada por los ratos de risas.

Muchas gracias a mi comité por su valiosa aportación al presente trabajo, a la Dra. Martha Salcedo, por ser siempre muy divertida y por sus consejos; gracias a la M. en C. Llarahí Gaviria, ojalá pudiera volver a tomar sus clases, estoy segura que las disfrutaría muchísimo; a la Dra. Ana Bores, por sus enseñanzas y por su participación en la mejora de este trabajo. ¡Todas son excelentes maestras, siempre sigan así, motivando a los alumnos con sus enseñanzas!!!

Gracias al Doc. Miguel Murguía por su apoyo incondicional, amabilidad y su aportación a este trabajo. Además de ser un profesor con “chispa” y sacarme una que otra risa, haciendo más amena hasta la peor situación.

Gracias a la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar, una gran persona dispuesta ayudar a los alumnos. ¡Gracias por tu apoyo!

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio y amigos de la carrera, que pese al tiempo que ya ha transcurrido y de nuestras actividades, siguen a mi lado compartiendo experiencias, risas y locuras.

Agradezco a los integrantes del laboratorio 7 de la UMF, UNAM, por la donación de las muestras para el desarrollo del presente trabajo de tesis. Así como al proyecto PAPIIT IN223113, de donde se obtuvo dicho material biológico.

Por último y no menos importante, agradezco la vida de aquellos organismos que son sacrificados en nombre de la ciencia. Especialmente de los conejitos y ratones que fueron utilizados en este trabajo con mucho respeto y ética.

Dedicatoria

A mis padres: Dedico orgullosamente mi trabajo de tesis a mi papá Antonio Ortiz y a mi mamita Marcela Reyes, quienes siempre se preocuparon por nosotras y nos brindaron todo lo que estuvo a su alcance, por sus cuidados y amor. Y por darme un tesoro que a veces no todos pueden acceder: el estudio. También por inculcar en mí todos los valores y responsabilidades que me formaron hasta hoy. Este trabajo de tesis es nuestro, aquí va plasmado su apoyo incondicional y por ello gracias. LOS AMO.

A mis hermanas Katya y Aleida, por estar unidas y hacer locuras, por ser mis confidentes y consejeras. También a mis sobrinas que son un tesoro y que deseo que todas juntas brillemos con luz propia, siendo exitosas en todo lo que nos proponamos.

Dedico este trabajo a mi mejor amigo Juan Tomas Gregorio Torres, jamás había tenido una amistad tan incondicional, honesta y bonita. Amigo, de corazón deseo que nos vaya muy bien en la vida. Gracias por estos años de tu apoyo, de nuestras locuras, de nuestras tardes de “dulces” y documentales, por las tardes de cocina, por cantar juntos las canciones de Silvio Rodríguez. Definitivamente la carrera no hubiera sido igual sin ti.

Con mucho cariño dedico este trabajo de tesis a mi primo Eduardo Granados Reyes, donde quiera que estés, espero que nos cuides. Y pese al tiempo que ha pasado no hay día que no piense en ti. Te quiero.

Por último, dedico también mi tesis a mi abuelito Jorge, sé que él estaría muy contento de saber de mi logro. Mi niñez en la “casa de los abuelitos”, es uno de los más dulces recuerdos que tengo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Obesidad. <i>Prevalencia y sus consecuencias en la salud</i>	9
1.2 Etiología de la obesidad. <i>Factores que influyen para padecerla</i>	11
1.3 Tejido adiposo. <i>Obesidad e inflamación de bajo grado</i>	14
1.4 Hígado. <i>Metabolismo de lípidos, estrés oxidante e inflamación</i>	17
1.4.1 Evaluación de la función hepática	22
1.5 Receptor de membrana tipo toll 4 (TLR-4).....	23
1.6 Ácido acetilsalicílico (AAS), ciclooxigenasa 2 (COX-2) e Interleucina 1 β (IL-1 β)	25
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	29
4. HIPÓTESIS	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6. RESULTADOS	39
6.1 Masa corporal	39
6.2 Química sanguínea.....	40
6.2.1 Metabolismo de carbohidratos	40
6.2.2 Perfil lipídico	43
6.2.3 Función hepática	49
6.3 Producción total de especies reactivas de oxígeno (ERO) en hígado	55
6.4 Reacción de transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).....	56
6.4.1 Eficiencia de cada par de oligonucleótidos	56
6.4.2 Expresión genética diferencial	59
7. DISCUSIÓN	60
7.1 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y función hepática.....	60
7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	64
7.3 Expresión de TLR-4, COX-2 e IL-1 β	67
8. CONCLUSIONES	70
9. REFERENCIAS	71
10. APÉNDICE	78
10.1 Extracto celular, ERO y cuantificación de proteínas por curva estándar de BSA.....	78

10. 2 Extracción de DNA mediante fenol básico	79
10.3 Extracción de RNA mediante fenol ácido	79
10.4 Gel desnaturizante	80
10.5 Electroforesis en gel de agarosa	80

ABREVIATURAS

- AAS: Ácido acetilsalicílico.
- ACC: Acetil-CoA carboxilasa.
- AINES: Antiinflamatorio no esteroideo.
- AOX: Sistemas antioxidantes.
- AP: Ácido palmítico.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- COX: Ciclooxygenasa.
- CTE: Cadena transportadora de electrones.
- DAMP: Patrones de moléculas asociadas a daño.
- DCDHF-DA: Diacetato de diclorodihidrofluoresceína.
- DEPC: Pirocarbonato de dietilo.
- DGAT: Diacilglicerol-acil-transferasa.
- DMT2: Diabetes mellitus tipo 2.
- EHNA: Esteatosis hepática no alcohólica.
- ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.
- EO: Estrés oxidante.
- ERO: Especies reactivas de oxígeno.
- FA: Fosfatasa alcalina.
- FADH2: Flavín adenín dinucleótido.
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAS: Sintetasa de ácidos grasos.
- FFA: Ácidos grasos libres.
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.
- HDL: Lipoproteína de alta densidad.
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.
- LDH: Deshidrogenasa láctica.
- LDL: Lipoproteína de baja densidad.
- LPS: Lipopolisacáridos.
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.
- OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- SCD1: Esteroil-Coa-desaturasa 1.
- SEA: Suministro de Energía Alimentaria.
- TAB: Tejido adiposo blanco.
- TAC: Tejido adiposo café.
- TG: Triacilglicérido.
- TGO: Transaminasa glutámico oxalacética.
- TGP: Transaminasa glutámico pirúvica.
- TLR: Receptores tipo toll.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.
- VLDL: Proteína de muy baja densidad.

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal y excesiva de lípidos en el tejido adiposo, causada principalmente por la falta de actividad física e ingesta excesiva de alimentos. La obesidad es perjudicial para la salud debido a que es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades como alteraciones cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico, entre otros, y que constituye un importante problema de salud público.

Un fenómeno reportado asociado a la obesidad es el desarrollo de un proceso inflamatorio de bajo grado, causado por la infiltración de células inmunológicas principalmente inflamatorias, al tejido adiposo (células T, neutrófilos y macrófagos M1). Aunado a esto, en el adipocito hipertrófico hay un aumento en la lipólisis generando la acumulación ectópica de ácidos grasos en otros tejidos y órganos, además de que numerosos mediadores inflamatorios son producidos por el tejido adiposo y que pueden ser secretados y, por tanto, afectar a otros órganos.

En el presente trabajo, en conejos jóvenes (3 meses de edad) de la cepa *Oryctolagus cuniculus* se evaluaron cambios generados por la ingesta de una dieta alta en lípidos (adicionada con 20% de ácido palmítico, AP) durante 3 meses. Se evaluaron los cambios en la masa corporal (peso), en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y en la función hepática. En muestras de hígado, se evaluó la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y cambios en la expresión de los genes: *IL-1 β* , *TLR-4* y *COX-2*, asociados con la respuesta inflamatoria, además de evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido acetilsalicílico (AAS) al ser administrado en conjunto con la dieta enriquecida con ácido palmítico (AP/AAS). Los resultados no mostraron un aumento significativo en la masa corporal que indicara sobre peso, puesto que todos los grupos al final del tratamiento tuvieron una ganancia promedio de 2 kg; tampoco se observaron cambios significativos en la concentración de insulina y glucosa sérica ni se distinguió un cambio en la función hepática que indicara daño.

En contraste, se observó un aumento en la concentración de lípidos, generando hipertrigliceridemia, un tipo de dislipidemia, en aquellos grupos donde se incluyó ácido palmítico en la dieta (AP y AP/AAS) ya que presentaron las mayores concentraciones de triacilglicéridos, colesterol total y colesterol LDL, y se observó una ligera disminución de colesterol HDL en el grupo AP.

En cuanto a la producción de ERO, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, la máxima producción de ERO se presentó en los grupos AP y AAS, mientras que en AP/AAS fue menor con respecto a estos grupos, lo cual puede evidenciar un probable efecto antioxidante del ácido acetilsalicílico. Por último, se descartó la presencia de una respuesta inflamatoria desarrollada en el hígado, debido a que no se encontró un aumento en la expresión de IL-1 β y COX-2. Sin embargo, la expresión de *TLR-4* aumentó 6 veces más en el grupo AP, 4 veces más en AAS y 1.7 veces más en AP/AAS con respecto al grupo control (CN). En el modelo de este trabajo, pese a que no existe una condición propiamente de sobre peso u obesidad ni inflamación, es claro que durante el tiempo de administración de la dieta alta en grasa (3 meses), se pueden generar cambios en el perfil lipídico, en la producción de ERO y un cambio en la expresión de moléculas asociadas al sistema inmune innato como lo es *TLR-4*, que puede comenzar a establecer y desencadenar una respuesta inflamatoria en hígado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 **Obesidad.** *Prevalencia y sus consecuencias en la salud*

Durante miles de años los seres humanos necesitaron enfrentarse a un ambiente que se caracterizó por la escasez de alimentos, esto implicó un constante proceso de adaptación y búsqueda de la comida que no siempre estaban disponibles. Posteriormente, en la historia de la humanidad apareció el desarrollo de la agricultura y ganadería, estas actividades hicieron que el hombre tuviese el abasto necesario para su alimentación. Incluso, en la población occidental se consideró como una cualidad el aumento de peso, porque era visto como un indicador de salud y prosperidad. Hoy en día la mejora de los estándares de vida y avances tecnológicos, han facilitado la vida del hombre, reduciendo la actividad física, que ha propiciado un aumento en el peso corporal y con el paso del tiempo un mayor índice de población con sobre peso y obesidad. Estos cambios son una amenaza creciente para la salud en diferentes países de todo el mundo (Alvarenga, 2004).

A partir del año 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó a la obesidad como una epidemia global, debido a la existencia de mil millones de adultos con sobrepeso y al menos 300 millones de estos con obesidad, lo que constituye un importante problema de salud pública. De acuerdo con la OMS, el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo blanco que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2000; OMS, 2015).

Anteriormente el sobrepeso y la obesidad se consideraba un problema exclusivo de los países de altos ingresos, sin embargo, están aumentando aceleradamente en países en vías de desarrollo, sobre todo en el medio urbano (García-García *et al.*, 2008). México no es la excepción, en el 2006 en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) se reportó que, en adultos de 20 años o mayores, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7%, lo que posicionó a México como uno de los países con mayor población obesa en la región de América. Aunado a esto, entre la ENSA-2000 y ENSANUT-2006, la prevalencia incremento más de 12%

convirtiéndose a México, además, en uno de los países con mayor tendencia de aumento de sobrepeso y obesidad en el mundo (Barquera *et al.*, 2009).

El problema de la obesidad y sobrepeso no solo se restringe a adultos, la ENSANUT-2012, identificó una prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años de 34.4% y en el grupo de adolescentes (12 - 19 años) del 35%, lo que significa que uno de cada 5 adolescentes tiene sobrepeso y uno de cada 10 obesidad (Gutiérrez *et al.*, 2012). Para la última ENSANUT realizada en el 2016, esta prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad no se vio modificada en la población infantil, sin embargo, en la población adolescente fue 1.4 puntos porcentuales superior a la prevalencia reportada en 2012. Por último, en adultos (≥ 20 años) la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en el 2016 fue de 72.5%, es decir, 1.3 puntos porcentuales mayor que en el 2012, aunque esta diferencia no se consideró significativa (ENSANUT, 2016).

El problema de sobrepeso y de obesidad en México tiene graves consecuencias para la salud de la población, porque es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades como: síndrome metabólico, que incluye la hiperglicemia y dislipidemia; disfunción endotelial, que con el paso del tiempo pueden conducir a otras enfermedades como: diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), enfermedades cardiovasculares, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), y algunos tipos de cánceres, además de afectar la fertilidad y aumentar el riesgo de anomalías del feto asociadas a la obesidad materna (Sánchez-Castillo *et al.*, 2004; Córdova *et al.*, 2010; Esser *et al.*, 2014).

Con el aumento del desarrollo de enfermedades crónicas hay una amenaza en el desarrollo económico, social, esperanza y calidad de vida de millones de personas (Córdova *et al.*, 2010); por ejemplo, la esperanza de vida en México ha incrementado lentamente y es la más baja entre todos los países de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) debido a los comportamientos dañinos para la salud como malos hábitos de nutrición, altas tasas de obesidad, y al incremento de mortalidad causada por la diabetes y/o enfermedades cardiovasculares (OCDE, 2014).

1.2 Etiología de la obesidad. Factores que influyen para padecerla

Inicialmente se pensó que el desarrollo de la obesidad estaba principalmente relacionado con factores genéticos; aunque, con la rapidez del incremento en la prevalencia que se ha observado en los últimos 40 años, los factores genéticos fueron descartados como única causa, ya que el grupo de genes responsables de la susceptibilidad a la obesidad no pueden variar en periodos de tiempo tan cortos (Barsh *et al.*, 2000). Sin embargo, lo anterior no excluye la propuesta de que hay genes que, si influyen en el metabolismo sin ser el factor determinante de la obesidad, por ejemplo, en los trabajos de ratones con mutación en el receptor de leptina, hormona que regula el apetito producida por adipocitos, se determinó que eran obesos debido al apetito descontrolado y, en consecuencia, al exceso en la ingesta de alimentos (Maffei *et al.*, 1995).

Hoy en día se ha propuesto que los factores que influyen en el desarrollo de sobrepeso u obesidad son de etiología multifactorial, que incluye factores sociales, económicos, ambientales y genéticos (Chudek & Wiêcek, 2006). Sin embargo, los factores principales sociales y económicos negativos que influyen en el desarrollo de la obesidad y/o sobrepeso son:

1) *Sedentarismo*: el cambio de hábito de actividad física en la población mexicana se ha modificado por diversas razones, el desarrollo de tecnologías que han facilitado las tareas domésticas y la reducción de actividades deportivas al aire libre y una educación deficiente que no fomenta la práctica de actividad física que afecta a la población de edades tempranas; de ahí que el sedentarismo se vincule directamente con el riesgo de padecer obesidad (Córdova *et al.*, 2010).

2) *La alimentación*: La dieta que consume la mayor parte de la población omite una de las tres comidas principales, además de rebasar las necesidades energéticas por persona, ya que, en el año 2000, se calculó que éstas eran de 2,182 kcal/día, sin embargo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), mediante el uso de los datos del Suministro de Energía Alimentaria (SEA), valoró en ese año para nuestro país el consumo de 3,159 kcal/día por persona, lo que representó 977 kcal/día por arriba de lo sugerido, esto

debido a la modificación en la ingesta de alimentos (García-Córdova *et al.*, 2010; Urigüen, 2012).

Aunado a esto, en la sociedad mexicana con el desarrollo, modernización y el ritmo de vida acelerado, principalmente en zonas urbanas, el paso de una comunidad agrícola, ganadera y minera a otra industrial y urbana, creó una nueva cultura para las prácticas alimentarias, con consecuencias negativas para la sociedad moderna (García-Urigüen, 2012).

Otros factores que influyen en el cambio de dieta del mexicano son los ingresos monetarios y la proporción que se destina a este rubro para satisfacer sus necesidades, esto condiciona la alimentación de los diversos grupos sociales, así como su forma y ritmo de vida, ya que la actividad laboral abarca periodos prolongados de tiempo, lo que disminuye el tiempo disponible para la preparación de alimentos en casa, propiciando un incremento en el consumo de comida rápida, alimentos industrializados e instantáneos, que son económicos, de fácil adquisición, rápida preparación y con palatabilidad agradable, pero que suelen ser adicionados con altas cantidades de sal, azúcares y grasas (García-Urigüen, 2012).

Un claro ejemplo de esto es el uso de los aceites vegetales en la industria alimenticia, como el aceite vegetal de palma africana o “palma aceitera” (*Elais guineensis*), que es ampliamente usado por su alto rendimiento en toneladas métricas por hectárea. El aceite de palma crudo está constituido por diversos componentes como: triacilgliceroles, vitamina E, carotenoides, fitoesteroles, fosfolípidos y ácidos grasos libres insaturados (p.ej. ácido oleico y el linoico), y saturados como el ácido esteárico y palmítico; sin embargo, para su uso en la industria alimenticia varios de estos componentes son removidos por procesos de refinación, blanqueamiento y desodorización, obteniendo un concentrado de ácido palmítico (Mba *et al.*, 2015).

El ácido palmítico (AP) es un ácido graso saturado de cadena larga alifática, conformado por dieciséis átomos de carbono. En la industria alimenticia se utiliza debido a sus características como el alto contenido de grasa sólida que evita procesos de hidrogenación, una alta estabilidad frente a la oxidación que aumenta

el tiempo de vida útil, un constante suministro y bajo costo. El AP se usa en la elaboración de diversos productos y subproductos alimenticios como: aceite comestible de cocina, reconstituyente para leche, mantequilla, helados, sustituto de cacao, suplementos vitamínicos, frituras, productos de panadería, pastelería, sopas instantáneas, diversos platos congelados y deshidratados, cremas no lácteas para café, salsas, mantequilla de maní, palomitas de microondas, dulces, análogos de queso, etc. (Mancini *et al.*, 2015; Mba *et al.*, 2015). Aunado a esto, la ingesta de AP puede ser derivado de productos de origen animal, como en las carnes rojas y productos lácteos, debido a que los mamíferos metabólicamente producen ácido palmítico durante la lipogénesis, y a partir de éste, se pueden formar otros ácidos grasos de cadena larga o con dobles enlaces (Holum, 2011).

1.3 Tejido adiposo. *Obesidad e inflamación de bajo grado*

El tejido adiposo no es un órgano homogéneo, está compuesto de diferentes tipos celulares como: preadipocitos, adipocitos, células estromales/vasculares y macrófagos (Rajala *et al.*, 2003). El tejido adiposo se divide en tejido adiposo blanco (TAB) y café (TAC). El TAB se distribuye en todo el cuerpo y comprende dos principales depósitos: el subcutáneo y visceral, este último, rodea los órganos internos y se subdivide en mesentérico, omental, perirrenal y retroperitoneal, y cada uno cumple funciones específicas (Figura 1) (Choe *et al.*, 2016).

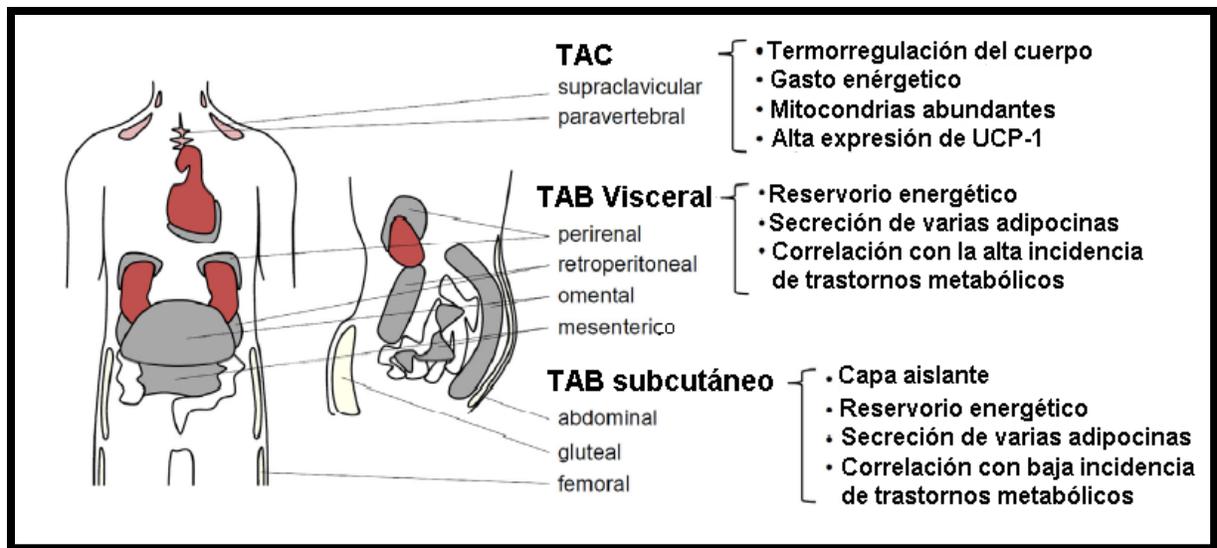


Figura 1. Clasificación del tejido adiposo. Tejido adiposo café (TAC) y el tejido adiposo blanco (TAB). TAB se subdivide en visceral y subcutáneo, y se distribuyen en diversas partes del cuerpo y cumplen diferentes funciones (Figura modificada de Choe *et al.*, 2016).

Durante varios años se creyó que la única función del tejido adiposo era ser un reservorio energético en forma de triacilglicéridos, el cual en condiciones de deficiencia de nutrientes suplía a otros tejidos de nutrientes mediante la lipólisis. Hoy en día se han reconocido otras funciones de este tejido como un órgano endocrino regulador de la homeostasis metabólica, ya que en el adipocito se sintetizan diferentes moléculas como péptidos, hormonas y citocinas (Choe *et al.*, 2016; Chudek & Wiêcek, 2006; Rajala & Scherer, 2003).

En el desarrollo de la obesidad, hay un exceso en la ingesta de nutrientes, en el caso de lípidos, estos son almacenados en el tejido adiposo en forma de lípidos neutrales, que conduce a la expansión del tejido mediante dos procesos: el aumento del número de adipocitos (hiperplasia) y el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) (Figura 2).

La hiperplasia es regulada por varios factores de transcripción y hormonas. Se ha demostrado que puede ejercer efectos benéficos para la salud, como la disminución de ácidos grasos libres y aumento a la sensibilidad a insulina. En contraste, la hipertrofia es asociada con anomalías en la función del adipocito, como la resistencia a la insulina e inducción de la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6, 8 y 1 β .

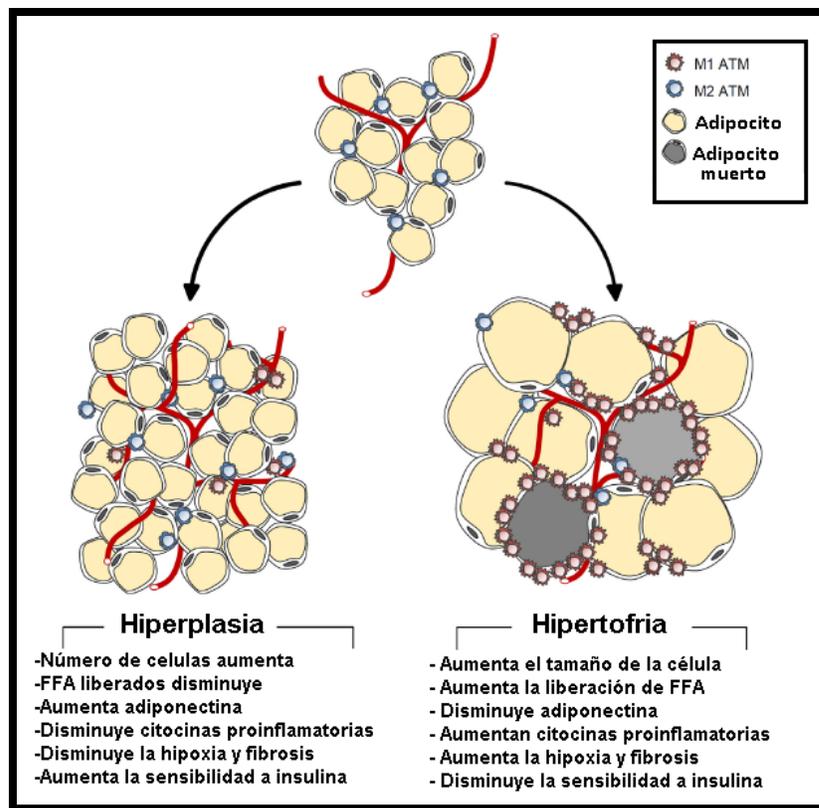


Figura 2. Mecanismos de expansión del tejido adiposo. La hiperplasia se caracteriza por el incremento del número de adipocitos, mientras que en la hipertrofia hay aumento en el tamaño y cambio de la morfología de los adipocitos debido al almacenamiento excesivo de ácidos grasos (Figura modificada de Choe *et al.*, 2016).

El tejido adiposo secreta una amplia variedad de moléculas, por tanto, se considera un órgano endocrino activo. En la obesidad un fenómeno reversible que se desarrolla es la infiltración de células inmunológicas en el tejido adiposo, alterando numerosas funciones de éste. Las principales células que aumentan son células T (necesarias para la migración, diferenciación y activación de macrófagos), neutrófilos y macrófagos M1 (clásicamente activados e involucrados en una respuesta tipo pro-inflamatoria) y macrófagos M2 (alternativamente activados e involucrados en una respuesta anti-inflamatoria), con el aumento de células pro-inflamatorias se disminuye el número de células anti-inflamatorias (células T reguladoras y macrófagos M2). En condiciones fisiológicas de homeostasis las células inmunes no tienen una función específica en el tejido adiposo, pero en la obesidad contribuyen al proceso inflamatorio de bajo grado, lo contrario ocurre cuando hay una pérdida de peso, ya que se ha demostrado que el número de éstas células disminuye, a partir de esto, se ha propuesto que en la obesidad ocurre una infiltración de células inmunes que participan la respuesta inflamatoria (Lyons *et al.*, 2016; Choe *et al.*, 2016; Chawla *et al.*, 2011).

Otra consecuencia de la obesidad es el aumento de la lipólisis basal en adipocitos hipertróficos que conduce a la pérdida de ácidos grasos libres, cuando esta pérdida es constante, dichos ácidos grasos van del tejido adiposo al torrente sanguíneo y suelen ser captados por otros tejidos u órganos, lo que predispone a la lipotoxicidad; además de ello, numerosos mediadores inflamatorios que son producidos por el adipocito hipertrófico pueden ser secretados y por tanto afectar a otros órganos y tejidos (Choe *et al.*, 2016; Wisse, 2004).

1.4 Hígado. Metabolismo de lípidos, estrés oxidante e inflamación

El hígado es un órgano indispensable en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, porque en él se regulan procesos de lipogénesis, gluconeogénesis y metabolismo del colesterol, además de presentar una alta irrigación sanguínea para el suministro y exportación de sustratos, hormonas y nutrientes (Fabbrini *et al.*, 2010). Los nutrientes provenientes de la dieta como ácidos grasos, aminoácidos y glucosa son absorbidos en el flujo sanguíneo y transportados al hígado, una vez en el hepatocito se metabolizan, por ejemplo, la glucosa se transforma en glucógeno, y los ácidos grasos pueden ser esterificados con glicerol para generar un triacilglicérido (TG) y de esta forma pueden ser almacenados o secretados a la circulación mediante una lipoproteína de baja densidad (VLDL) (Rui, 2014).

En el metabolismo de los lípidos, la cantidad de TG presentes en hepatocitos comprende una interacción compleja entre: (Fabbrini *et al.*, 2010; Rui, 2014).

1) *Ácidos grasos consumidos*. Los TG y ácidos grasos libres provenientes del plasma ya sea de la dieta o liberados principalmente del tejido adiposo subcutáneo, y en menor cantidad del tejido adiposo visceral son captados y metabolizados por el hígado.

2) *Exportación de ácidos grasos del hepatocito al torrente sanguíneo mediante la proteína VLDL*. Esta lipoproteína producida por el hígado se une con los TG, dicha unión permite que sea soluble en agua y de esta forma pueda ser secretada al sistema circulatorio y transportada a otros órganos y tejidos; aquellos ácidos grasos que no son oxidados, son esterificados en TG y pueden ser incorporados dentro de VLDL, o bien, pueden ser almacenados en el hígado. Este proceso de transporte y secreción de VLDL proporciona un mecanismo para la reducción del contenido de TG intrahepáticos (Figura 3).

3) *La síntesis de ácidos grasos (Lipogénesis de novo)*. El hígado es el órgano principal en el cual los carbohidratos son convertidos en ácidos grasos, esta lipogénesis hepática es baja en el ayuno y aumenta significativamente durante la alimentación. La tasa de Lipogénesis de *novo* es regulada por diferentes complejos y enzimas citosólicas como la sintetasa de ácidos grasos (FAS), acetil-CoA

carboxilasa (ACC 1 y 2), diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT 1 y 2), esteroil-Coa-desaturasa 1 (SCD1) y varios factores de transcripción nucleares. Además de esto, la lipogénesis de *novo* es regulada independientemente por insulina y glucosa, a través de la activación de SREBP-1c y ChREBP, que a su vez activan otros genes involucrados en esta vía. La contribución de la lipogénesis de *novo* al total de TG intrahepáticos es del 5% de los ácidos grasos incorporados en la secreción de VLDL-TG.

4) *La oxidación de ácidos grasos.* En el metabolismo de los lípidos, la cantidad de TG presentes en hepatocitos comprende una interacción compleja entre los procesos metabólicos del hígado y la cantidad de energía requerida, por tanto, se ha estimado que la oxidación de ácidos grasos y aminoácidos provee cerca del 90% del combustible para los requerimientos energéticos hepáticos basales. La oxidación intrahepatocelular de ácidos grasos ocurre principalmente en la mitocondria y en menor medida en peroxisomas y microsomas.

La β -oxidación mitocondrial es una ruta metabólica aerobia de la que se obtiene energía mediante la oxidación de ácidos grasos hasta su degradación completa; progresivamente se acortan los acil-CoA del ácido graso en dos carbonos, y en cada ciclo se libera el acetil-CoA, y se llevan a cabo reacciones de deshidrogenación, hidratación y de escisión que involucra unión a membrana y enzimas, y que son reguladas transcripcionalmente por PPAR- α . Cada acetil-CoA derivado de la β -oxidación, puede ingresar al ciclo de Krebs para completar la oxidación y suministrar los sustratos requeridos como el nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH₂) que se requieren para la fosforilación oxidativa y síntesis de ATP, así como protones de hidrogeno (H⁺) que son necesarios para la actividad de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Figura 4), o bien, este acetil-CoA producido puede ser transformado en cuerpos cetónicos y de esta forma ser exportados a otros tejidos para su uso como combustible (Trauner *et al.*, 2010; Fabbrini *et al.*, 2010; Rui, 2014).

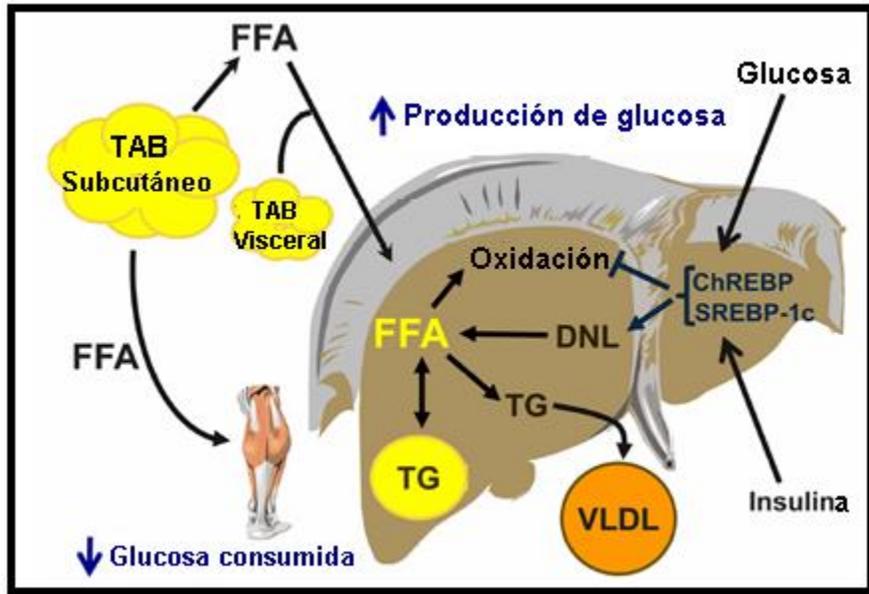


Figura 3. Metabolismo de lípidos en hígado. Los ácidos grasos libres (FFA) provenientes del tejido adiposo blanco (TAB) subcutáneo y visceral ingresan al hígado y son transformados en triacilglicéridos (TG); estos pueden ser almacenados, o esterificados dentro de VLDL para su transporte, o bien, son metabolizados en la β -oxidación, ruta regulada por factores de transcripción nucleares (SREBPs y ChREBP), y que pueden estimular la lipogénesis de *novo* (DNL) (Figura modificada de Fabbrini *et al.*, 2010).

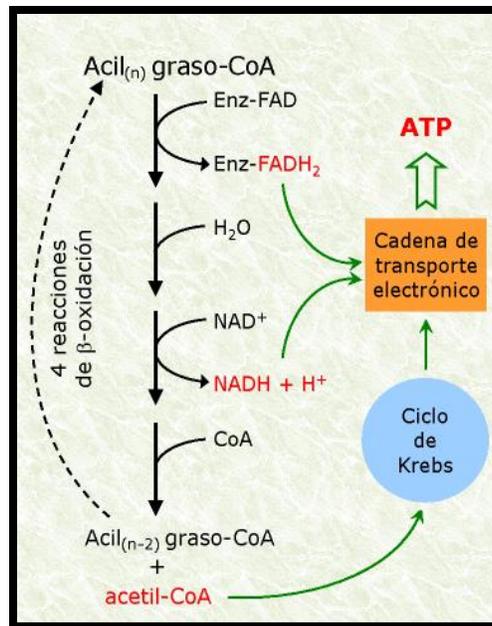


Figura 4. β -oxidación. Es una ruta metabólica de la que se obtiene energía mediante la oxidación de ácidos grasos lineales hasta su degradación completa, obteniendo cofactores como FADH_2 y NADH y protones de hidrogeno necesarios para la CTE y acetil-CoA que puede proseguir en el metabolismo oxidativo entrando al ciclo de Krebs (Figura obtenida de la página de internet: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/acgr-b-oxidacion.htm>).

Por otra parte, cuando la capacidad de almacenamiento de ácidos grasos en el hígado aumenta, estos son hidrolizados de nuevo a acil-coenzima A, excediendo los requerimientos oxidativos de la célula, provocando desregulación en la oxidación de ácidos grasos y formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Unger & Orci, 2000).

Las ERO incluyen radicales libres que contiene uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular. El grupo de las ERO es diverso y comprende entre otros el oxígeno singulete, anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). En condiciones fisiológicas normales, las ERO son producidas generalmente por reacciones de óxido-reducción, principalmente en la mitocondria durante la respiración en la CTE, aunque existen otras fuentes de formación de ERO como la actividad de algunas enzimas (p.ej. xantina oxidasa), o la reacción de algunas ERO con iones de metal (p.ej. reacción de Fenton) o componentes (p.e. el anión peroxinitrito, $ONOO^-$). Para evitar daños por el exceso de ERO, la célula tiene sistemas antioxidantes (AOX) que comprenden enzimas (p.ej. catalasa y superóxido dismutasa) y antioxidantes (p.ej. vitamina E y C) que ayudan a mantener el estado redóx de la célula mediante la neutralización de las ERO. Sin embargo, cuando hay una desregulación constante en la producción de ERO y AOX, por el aumento en producción de ERO y la saturación de los sistemas antioxidantes en la célula, se puede establecer una condición de estrés oxidante (EO). El exceso de ERO puede dañar las biomoléculas de la célula como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y de esta forma promover el desarrollo de respuestas celulares como inflamación, envejecimiento y apoptosis (Kohen & Nyska, 2002; Mahmood, *et al.* 2009).

Queda claro que el desarrollo de un estado crónico proinflamatorio en individuos obesos está relacionado con la ingesta constante y excesiva de nutrientes, esta respuesta ha sido ampliamente reportada en tejido adiposo, debido al aumento en la expresión del ARN mensajero que codifica para las proteínas de factores de transcripción (p.ej. TNF- α y factor inhibidor de migración de macrófagos), proteínas para la síntesis de hormonas (p.ej. leptina, resistina y adiponectina) y citocinas inflamatorias como interlucina 6 y 1β (Wisse, 2004).

En hígado se ha detectado la expresión de algunas de estas moléculas, que asemejan el proceso inflamatorio crónico de bajo grado desarrollado en tejido adiposo, en este órgano las moléculas pro-inflamatorias han sido asociadas a enfermedades o daño hepático tales como: fibrosis, cirrosis, y esteatosis hepática. Además, éstas moléculas forman parte de la respuesta inflamatoria en la obesidad, la hiperlipidemia, síndrome metabólico y DMT2, en las que generan resistencia a la insulina, causando una inhibición de la lipasa en tejido adiposo aumentando la cantidad de ácidos grasos liberados y por consecuencia en el hígado aumentan la concentración de ácidos grasos que son esterificados a TG. Esto causa el aumento de EO y producción de citocinas pro-inflamatorias, lo conduce a la ocurrencia de lesiones en hepatocitos (Hijona *et al.*, 2010). Aunado a esto, el hígado contiene células de Kupffer que también contribuyen en el proceso inflamatorio con la producción de citocinas y proteínas quimio atrayentes que activan otras células como las células estrelladas hepáticas, contribuyendo así al daño hepático (Lui *et al.*, 2010).

Por último, aun con esta evidencia no se conoce a fondo cómo es que se relaciona y desarrolla la respuesta inflamatoria con la producción de ERO en el hepatocito causada por la ingesta de una dieta alta en lípidos. En varios trabajos se ha reportado que en la obesidad aumenta la producción de ERO, por ejemplo Furukawa y colaboradores (2004) reportaron que el aumento de grasa corporal en ratones y humanos se correlaciona con el incremento de estrés oxidativo en tejido adiposo; Milagro y colaboradores (2006) también reportaron un incremento de EO en hígado de ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa con respecto al grupo control; aunado a lo anterior encontraron una correlación positiva de EO con la masa corporal y el aumento de expresión de ARN mensajero de leptina. Matsuzawa y colaboradores (2007), en un modelo de ratón alimentados con una dieta aterogénica (compuesta de grasa de cacao y colesterol), encontraron un mayor daño producido en células hepáticas por EO que concordó con una respuesta severa de inflamación y aumento de expresión de genes involucrados en la fibrogénesis, así como de cambios morfológicos del tejido hepático, predisponiendo de esta forma el desarrollo de fibrosis y sus consecuencias fisiológicas.

1.4.1 Evaluación de la función hepática

Como se mencionó en el apartado de 1.4 *Hígado*; este órgano lleva a cabo varios procesos metabólicos de síntesis, desintoxicación y excreción, por lo cual no existe una prueba que tenga la capacidad de detectar el estado de la función total del hígado. Sin embargo, en el ámbito clínico se utilizan un conjunto de pruebas, denominadas pruebas de “función hepática”. Estas pruebas se utilizan en general para: 1) determinar presencia o ausencia de daño hepático, 2) realizar diagnósticos específicos, 3) determinar severidad y establecer pronósticos y 4) monitorizar el curso de una enfermedad hepática (Daza *et al.* 2008; Mariel & Outomuro, 2009).

Por tanto, la mayoría de estas pruebas indican la presencia de daño hepático y falta de permeabilidad de vías biliares. Entre estas pruebas esta la medición de aminotransferasas, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA) y deshidrogenasa láctica (LDH). Dentro de las aminotransferasas está la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) normalmente encontrada en una diversidad de tejidos como hígado, corazón, músculos, riñón y cerebro, y la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) que se encuentra en mayor concentración en hígado. Estas enzimas presentes en células hepáticas catalizan la transferencia de los grupos aminos para producir ácido oxaloacético y pirúvico, respectivamente, y son los indicadores más comúnmente utilizados para evaluar la presencia de daño o necrosis hepática, debido a que son liberadas del hepatocito a la circulación aumentando su concentración sérica y con ello indicando daño en hígado (Daza *et al.* 2008; Mariel & Outomuro, 2009).

La GGT, por otra parte, regula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares al catalizar la transferencia de un grupo glutamil a los aminoácidos libres; esta proviene casi exclusivamente del hígado. La FA del hígado se encuentra en la superficie canalicular y por tanto es un marcador de disfunción biliar, esta enzima hidrolasa es responsable de eliminar grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas. Por último, la LDH es una enzima presente en el citoplasma de los hepatocitos y cataliza la oxidación reversible a ácido pirúvico (Daza *et al.*, 2008).

La concentración de estas enzimas puede variar bajo diferentes condiciones como la diabetes, hiperlipidemia, sobrepeso e hígado graso no alcohólico (Mariel & Outomuro, 2009). Sin embargo, no se sabe si puede presentarse un cambio en su concentración causado por la ingesta de una dieta alta en grasa; por ello la medición de todas estas enzimas en conjunto podría ser utilizada para el diagnóstico temprano de anormalidades hepáticas asociado a esta ingesta.

1.5 Receptor de membrana tipo toll 4 (TLR-4)

Los receptores tipo toll (TLR por su sigla en inglés), son una familia de receptores transmembranales, y su activación involucra una cascada de señales de transducción que inicia con las interacciones proteína-proteína de sus ligandos, receptores, y co-receptores, que luego continúa con la transmisión de señales que llegan al núcleo y se unen a factores transcripcionales que regulan genes de respuesta. De esta forma participan en diferentes procesos como: supervivencia celular, apoptosis, y principalmente en la respuesta de la inmunidad innata; esta respuesta es llevada a cabo mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) presentes en bacterias, virus y algunos hongos (Mencin *et al.*, 2009).

Dentro de esta gran familia de TLR, uno de los más estudiados es el receptor tipo toll 4 (TLR-4), presente en la membrana celular, este es activado por la unión con lipopolisacáridos (LPS), componente presente en membrana de bacterias gram-negativas, en esta activación es necesaria la participación de co-receptores como CD14 y MD-2, involucrados en el reconocimiento y unión de LPS, esta activación conduce a la cascada de señalización para una respuesta inmune ante bacterias (Mencin *et al.*, 2009).

Sin embargo, se ha indicado que la activación y señalización de TLR-4, puede estar mediada también por otras vías y/o ligandos de origen intra o extracelular, estimulados por estrés o enfermedades; estas moléculas son clásicamente llamadas “patrones de moléculas asociadas a daño” (DAMP) (Mencin *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, el hígado es un órgano clave en el control de la homeostasis metabólica, sin embargo, otra función importante que desempeña es la desintoxicación mediante la transformación de compuestos o moléculas nocivas a metabolitos inactivos; debido a que el hígado está anatómicamente vinculado con el intestino, está expuesto a una constante interacción con productos bacterianos derivados del intestino, principalmente a lipopolisacáridos, que el hígado se encarga de metabolizar para su desintoxicación. Por esta razón se ha sugerido que el hígado tiene una alta tolerancia a estos componentes derivados de la microbiota intestinal y de esta forma, en condiciones normales, es común encontrar bajos niveles de expresión de ARNm de receptores tipo Toll, sin embargo, tanto en células parenquimatosas y no parenquimatosas del hígado, la expresión de TLR puede ser activada en respuesta al daño derivado de una variedad de etiologías (Gou & Friedman, 2010).

En el caso del TLR-4, este puede ser activado en hígado en diferentes enfermedades como hepatitis, hígado graso alcohólico y no alcohólico, padecimientos autoinmunes e inducidos por drogas. Durante la activación y expresión de TLR-4 en hígado, múltiples factores en cascada son regulados, la mayoría involucrados en una respuesta de tipo inflamatoria, que tienen que ver con una respuesta inmune innata como la liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1), citocinas quimiotácticas, enzimas pro-inflamatorias como ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ERO, entre otros (Lu *et al.* 2008; Gou & Friedman, 2010).

1.6 Ácido acetilsalicílico (AAS), ciclooxigenasa 2 (COX-2) e Interleucina 1 β (IL-1 β)

En el campo clínico es común el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para el tratamiento de dolor e inflamación; uno de los AINES de uso frecuente es el ácido acetilsalicílico (AAS), el cual posee propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas y se ha descrito como un medicamento antitrombótico, que bloquea la producción de tromboxanos en plaquetas y de esta forma ayuda a la prevención de eventos cardiovasculares debido a que reduce la adhesión de plaquetas en la pared de venas (Vandvik *et al.*, 2012). El uso frecuente de AAS ha conducido a la investigación más profunda sobre sus beneficios o efecto en diferentes dosis constantes para el tratamiento de diferentes padecimientos como síndromes coronarios agudos, prevención primaria (grupos de alto riesgo) y secundaria de enfermedades asociadas al corazón e incluso existe literatura que indica que el AAS funciona como antioxidante en ciertas condiciones celulares (Vandvik *et al.*, 2012; Nansseu & Noubiap, 2015).

El AAS es un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa (COX). Esta enzima presenta dos iso-formas: COX-1 y COX-2, cada una codificada por un gen diferente, pero ambas son inhibidas por AAS. El mecanismo de acción específico de AAS se basa en la interrupción de la síntesis de prostaglandina G₂, mediante la inhibición irreversible de COX. Cuando el ácido araquidónico se libera de la membrana fosfolipídica por la acción de la fosfolipasa A₂, activada por diversos estímulos, es transformado en prostaglandina G₂ mediante la COX-1 y COX-2, de este compuesto puede formarse diferentes prostanoideos, principalmente en tromboxano A₂ y prostaciclina. El AAS inhibe de forma irreversible a la COX mediante su unión al residuo 120 de arginina (punto de unión de los AINES) y acetila una serina (serina 516 para COX-2), evitando de esta forma que la COX pueda usar su sitio catalítico, una vez que AAS acetila a la enzima, se transforma en ácido salicílico (Figura 5) (Arzamendi *et al.*, 2006; Nansseu & Noubiap, 2015).

La COX-2 se localiza en la membrana nuclear, y aunque su expresión sea principalmente en algunos órganos (p.ej. cerebro o riñones), se ha demostrado que también es inducible en otros tipos celulares en respuesta a algunos mediadores de

inflamación como algunas citocinas, por ejemplo, interleucina 1 (IL-1), LPS y radicales libres; por tanto COX-2 es también un potente mediador de la respuesta inflamatoria por su producción de prostaglandinas, además se ha sugerido que COX-2 puede estar involucrada en procesos fisiológicos normales en la célula (Crofford, 1997).

Como ya se mencionó, la citocina IL-1 pertenece a una superfamilia de citocinas, la mayoría con propiedades inflamatorias debido a su habilidad para estimular la expresión de genes asociados con la inflamación. En algunos tejidos se ha demostrado que un agonista de esta familia es la interleucina 1 beta (IL-1 β) (Dinarello, 2002). La IL-1 es principalmente producida por fagocitos mononucleares activados, neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales y su actividad es inducida por diversos ligandos que incluye: LPS, otras citocinas (TNF α , IL-2, IL-3 y IL-12), el factor estimulante de colonias de macrófagos, los factores de daño celular, los factores de coagulación, lípidos (p.ej. LDL oxidadas) y algunos medicamentos. Además, en animales y humanos inyectados con IL-1 y en células expuestas a IL-1, tiene la capacidad de estimular la actividad de COX-2, fosfolipasa A tipo 2 e iNOS, debido al aumento en la cantidad de prostaglandina E2, activación del factor plaquetario y la producción de óxido nítrico, que de esta forma puede agudizar la respuesta inflamatoria (Dinarello, 2002; Vélez-Castrillón *et al.*, 2004).

También se ha reportado un efecto nocivo, o efectos secundarios derivados de su consumo, siendo controversial su verdadera efectividad o beneficio, por lo cual es necesario seguir investigando su efecto con diferentes variables experimentales para entender mejor su mecanismo de acción; por ello en el presente trabajo, se propone un efecto benéfico del AAS en dosis antiinflamatorias para el tratamiento de la inflamación crónica de bajo grado ocasionada por la obesidad o el consumo de dietas altas en grasa.

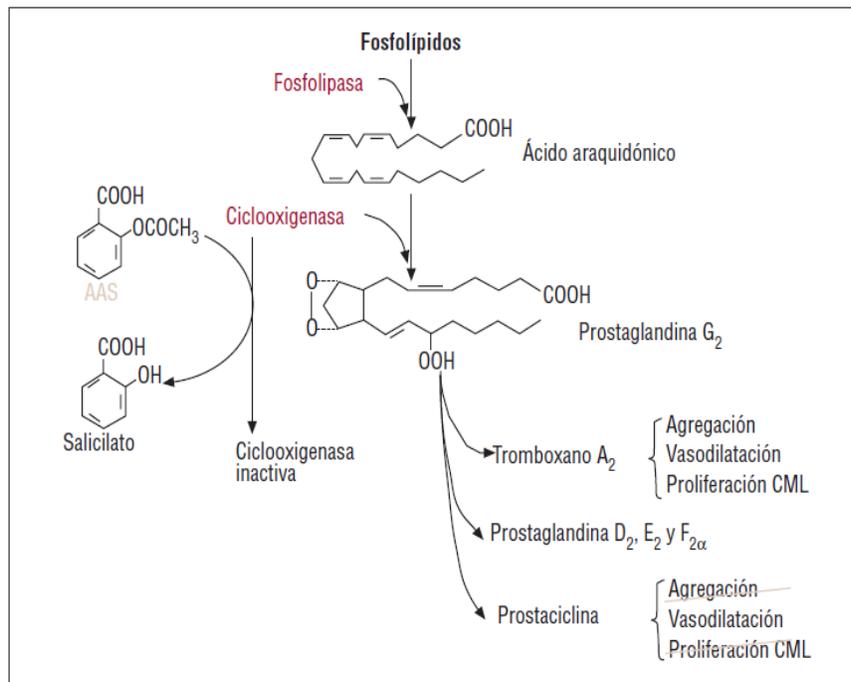


Figura 5. Mecanismo de acción del AAS sobre la inhibición de COX. El ácido araquidónico es transformado en prostaglandina G_2 por acción de COX. A partir de ésta se sintetizan otros prostanoides involucrados en diferentes procesos celulares. La acetilación de COX por AAS la inhibe, evitando la reacción del ácido araquidónico. Al final del AAS queda un producto de salicilato (Figura tomada de Arzamendi *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Con el incremento de la prevalencia de la obesidad en la población mexicana, aumentó el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas; por ello es prioridad en la investigación biomédica entender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de estas enfermedades y su asociación con la obesidad.

Aunque ya está reportado que en el tejido adiposo el almacenamiento excesivo de triacilglicéridos promueve la inflamación de bajo grado, en el caso del hígado, falta estudiar cómo una dieta alta en grasa puede desencadenar dicho proceso inflamatorio y su relación con la producción de ERO, así como entender qué moléculas están involucradas en esa respuesta. Aunado a esto, la mayoría de los trabajos publicados con este enfoque, han sido en modelos *in vitro* de cultivos celulares, o bien, *in vivo* con el uso de ratones y ratas, los cuales no son modelos recomendados para el estudio de procesos metabólicos, debido a que estos organismos secretan hormonas que los hacen resistentes a padecer obesidad, por tanto, un modelo adecuado para el estudio de fenómenos metabólicos debido a las similitudes con el humano es el uso del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Schnupf & Sansonetti, 2012).

Por ello, en el presente trabajo se presentan los resultados del efecto de una dieta adicionada con 20% de ácido palmítico administrada por tres meses a conejos jóvenes. Los efectos evaluados fueron cambios en el perfil de carbohidratos, de lípidos y la función hepática, así como en la expresión de moléculas inflamatorias y producción de ERO en hígado de conejo, que pudiera generar una respuesta inflamatoria de bajo grado y si esta disminuye con la administración de dosis antiinflamatorias de ácido acetilsalicílico, un AINES con múltiples indicaciones, de amplio uso y de fácil acceso.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si en conejos con administración de una dieta alta en lípidos existe un aumento en la masa corporal, cambios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y la función hepática, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y cambios en la expresión de los genes: interleucina 1 β (*IL-1 β*), receptor de membrana tipo toll 4 (*TLR-4*) y ciclooxygenasa 2 (*COX-2*).

Objetivos Particulares:

- Determinar la diferencia en la masa corporal (peso) entre los conejos alimentados con dieta normal y los conejos alimentados con una dieta adicionada con 20% de ácido palmítico, y ácido palmítico con ácido acetilsalicílico.
- Evaluar en los grupos experimentales cambios en la concentración sérica mediante química sanguínea de: glucosa e insulina (metabolismo de carbohidratos), triacilglicéridos, colesterol, colesterol HDL y LDL (metabolismo de lípidos) y TGO, TGP, FA, GGT y LDH (función hepática).
- Determinar la producción de ERO totales de extractos celulares de hígado de conejo mediante el uso de 2',7'- diclorofluoresceína (DCFDA).
- Evaluar la expresión de los genes *IL-1 β* , *TLR-4* y *COX-2* con respecto a un control endógeno constitutivo como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) mediante RT-PCR tiempo real y análisis de $\Delta\Delta Ct$.

4. HIPÓTESIS

La ingesta de una dieta enriquecida con un porcentaje alto de grasa durante un periodo de 3 meses en conejos jóvenes, generará alteraciones en la concentración sérica de glucosa, insulina, colesterol, TG, HDL y LDL, y enzimas asociadas a la función hepática; mientras que en el hígado habrá una mayor producción de ERO e incremento de la expresión de los genes: IL-1 β , TLR4 y COX-2 asociados a una respuesta inflamatoria. Además, con la administración de un AINES (ácido acetilsalicílico) durante la ingesta de grasa se prevendrá la expresión de las moléculas asociadas a inflamación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Implementación del modelo de dieta alta en grasa en conejos jóvenes

En este trabajo se utilizaron conejos gazapos machos (3 meses de edad) de la cepa Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), provenientes de la granja de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán, UNAM. Los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de bioética y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (De Aluja, 2002).

Los conejos fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, con condiciones estándar de crecimiento: temperatura de $23 \pm 5^\circ$ C, con ciclo de 12 h oscuridad/12 h luz y humedad controlada.

Los conejos fueron separados en cuatro grupos:

- Grupo Control (CN): con acceso libre a agua y comida.
- Grupo Grasa (AP): con acceso libre a agua y comida adicionada con 20% de ácido palmítico.
- Grupo Grasa-Ácido acetilsalicílico (AP/AAS): con acceso libre a agua y comida con 20% ácido palmítico y la administración de una dosis antiinflamatoria de ácido acetilsalicílico (28.5 mg/kg)*.
- Grupo Ácido acetilsalicílico (AAS): con libre acceso a agua y comida, y la administración de ácido acetilsalicílico (28.5 mg/kg).

*Las dosis administradas de ácido acetilsalicílico fueron calculadas con base en la dosis prescrita para uso antiinflamatorio en clínica. Esta dosis correspondió a 28.5 mg/kg y fue ajustada para cada organismo con base en su peso.

Los tratamientos fueron suministrados diariamente durante 3 meses y todos los grupos fueron pesados cada mes.

Obtención de las muestras biológicas

Al concluir los 3 meses de administración de la dieta, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (63 mg/2.5 kg de peso) y se realizó la disección de órganos; del hígado se obtuvieron muestras que fueron lavadas con buffer de fosfatos 1X (PBS) (ver apéndice 10.1), colocadas en tubos eppendorf, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas en un ultracongelador a -70°C.

Metabolismo de carbohidratos, lípidos y función hepática

Durante los tres meses de administración de la dieta, a los conejos se les tomó una muestra de sangre cada mes, las muestras fueron enviadas para su análisis al laboratorio de referencia internacional Grupo Diagnóstico Médico PROA S.A. de C.V. (Laboratorio CARPERMOR).

Extracto celular, determinación de ERO totales y cuantificación de proteínas

La evaluación de ERO se hizo de acuerdo al método modificado de Hempel *et al.* (1999) y el extracto celular se obtuvo con el ensayo modificado de Song *et al.* (2013). De cada hígado se pesaron 100 mg, para eliminar el exceso de sangre se lavó con PBS 1X, el tejido se colocó en un tubo eppendorf con 500 µl de PBS 1X en hielo y se maceró con un micro homogeneizador de teflón. Para inhibir la actividad de proteasas y evitar la degradación de proteínas, a cada tubo se le adicionó 5 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM (PMSF) y se agitó suavemente, posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 3 minutos a -4°C; se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, y la muestra se preparó de la siguiente forma:

50 µl de muestra + 195 µl de PBS 1x + 5 µl de stock de 2',7'- DCFDA (500 µM) =
250 µl totales.

El diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína (DCFDA) es utilizado para detectar el H₂O₂ intracelular y otros radicales que indican estrés oxidativo. La reacción de oxidación que ocurre con dos electrones de la DCFDA y el ERO (radicales libres) de la muestra, formando el compuesto diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescencia (Kalyanaraman *et al.*, 2012). La preparación de muestras se hizo por duplicado, y

fueron colocadas en placas de 96 pozos con fondo transparente y paredes oscuras y se midió la fluorescencia en un fluorómetro (Biotek) a una longitud de onda de emisión de 485 nm y de excitación de 520 nm, las lecturas se hicieron cada 10 min por 1 h, y como blanco de la reacción, en un pozo se añadieron todos los reactivos sin extracto celular. Los datos de fluorescencia se recolectaron para su posterior análisis.

Para asegurar la homogeneidad de las muestras y corroborar que el nivel de ERO cuantificado era resultado de las variables experimentales y no por diferencias en la cantidad de tejido empleado en este ensayo, se cuantificó la proteína total de cada una de las muestras, espectrofotetría de UV a 280 nm (Stoscheck, 1990) y una curva estándar de concentración de albúmina de suero bovino (BSA) (ver apéndice 10.1).

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del peso corporal (kg), de la química sanguínea (carbohidratos, lípidos y función hepática) y producción de ERO, se obtuvo la desviación estándar (SD) y el error estándar de la media (SEM) y se aplicó la prueba estadística de *t* de Student, con un valor de significancia de 0.05 (*P value*) en el programa estadístico GraphPad Prism 5.

Extracción de ADN por fenol básico

De la muestra de hígado se pesó aproximadamente 0.1 gramos de tejido, y se lavó con agua estéril para quitar el exceso de sangre, se cortó en trozos pequeños en una caja Petri colocada en hielo con una navaja de bisturí estéril. Posteriormente se transfirió a un tubo eppendorf de 1 ml estéril con 200 μ l de Buffer de lisis (ver apéndice 10.2) y se maceró el tejido con un micro homogeneizador de teflón.

Una vez homogeneizado, el tejido se transfirió a un tubo nuevo previamente calentado (65°C) que contenía 250 μ l de la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (ver apéndice 10.2) y perlitas de vidrio, se pasó por vortex durante 30 segundos y el tubo se incubó en baño maría a 65°C por 5 minutos; este paso se realizó dos veces. Después se agregaron 200 μ l de agua estéril y se centrifugó a 13

000 rpm por 5 minutos, obteniendo tres fases. La fase acuosa más superficial se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión hasta ser visibles las hebras de ADN. Este se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Una vez formado el precipitado de ADN, se desechó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente en 400 µl de agua estéril y se agregó 3 µl de la solución de ARNasa (10 mg/ml) y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 10 µl de acetato de amonio (4M) y 1 ml de etanol (100%) para precipitar nuevamente el DNA y se incubó a -20°C por 20 minutos, por último, se centrifugó a 13 000 rpm 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El etanol remanente se eliminó al dejar secar el tubo abierto junto al mechero (5 minutos) y el ADN se resuspendió cuidadosamente en agua DEPC (30-50 µl).

Purificación y cuantificación del ADN

Para la eliminación de remanentes proteicos y exceso de sales en la muestra de ADN, este se purificó con un *Kit Gfx PCR DNA and Gel Band Purification* (Ambiom). Posteriormente, la concentración y la calidad del ADN de cada muestra se determinó mediante espectrofotometría con luz UV, se obtuvo la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm y se calculó la relación de los dos valores de absorbancia A260/A280 (Sambrook *et al.*, 1989), con esta relación se comprueba la calidad del ADN/ARN en la muestra:

- ❖ Valores de relación entre 1.5 indican una calidad y pureza buena.
- ❖ Valores de 1.2 indican una calidad y pureza regular.
- ❖ Valores menores a 1.2 indican una calidad y pureza mala.

Una vez verificada la calidad de la muestra se calcula la concentración para su posterior uso en los ensayos, mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = (A_{260}) (\text{FD}) (\text{CE})$$

Donde:

CE*: es el coeficiente de extinción molar que para ADN es de 50 µg/ml y para ARN es de 40 µg/ml por cada unidad de A₂₆₀.

FD: es el factor de dilución de la muestra.

Para convertir la concentración en ng/ml dividir el resultado entre 1000.

*El coeficiente extinción molar es un parámetro que define cuánta luz absorbe una sustancia a una dada longitud de onda por unidad de masa o por concentración molar.

Extracción de ARN total por fenol ácido

La extracción de ARN total se hizo de acuerdo al método modificado de Schmitt & Trumpower, (1990). De cada muestra se usaron 0.1 gramos de tejido. Este se cortó en trozos pequeños en una caja Petri en hielo y se lavó con buffer AE (ver apéndice 10.3). Luego el tejido se transfirió a un tubo eppendorf estéril con 500 µl de buffer AE y 5 µl de DEPC y se agitó suavemente. El tejido lavado se transfirió en otro tubo eppendorf estéril calentado a 65°C que contenía 400 µl de fenol ácido, 20 µl de SDS (20%) y perlititas de vidrio. Una vez transferido el tejido se dejó 5 minutos en baño maría a 65°C, después se agitó en vórtex por 30 segundos (este paso se repitió dos veces), después se colocó el tubo a -70°C por 5 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa superficial en un tubo nuevo y se adicionó 400 µl de fenol, para eliminar remanentes proteicos, se agitó en vórtex y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y nuevamente se recuperó la fase acuosa y se agregó 250 µl de fenol y 240 µl de la mezcla cloroformo-isoamílico, se agitó en vórtex y se centrifugó. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa y se registró el volumen total obtenido, a este volumen final se le adiciono 0.1 volumen de acetato de sodio (3 M) y 2.5 volúmenes de etanol (100%) para precipitar el ARN. El ARN se dejó reposar en ultracongelador (-70° C) por 30 minutos y después de la incubación se centrifugó por 15 minutos a 13, 000 rpm, y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con alcohol al 75%, cuidando de no perderlo, y se dejó secar junto mechero por 5 minutos, finalmente se resuspendió cuidadosamente en agua con DEPC (30-50 µl) y se almacenó a -70°C.

Gel desnaturizante, purificación y cuantificación del ARN

La pureza y calidad del ARN total se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%) en condiciones desnaturizantes (ver apéndice 10.4). Para eliminar el ADN remanente en las muestras, se utilizó un sistema comercial de ADNasa (Ambion RNA by life Technologies, DNA-free), nuevamente se cuantificó el ARN

para verificar la cantidad recuperada y en gel desnaturalizante se rectificó la pureza e integridad del ARN (Figura 6).

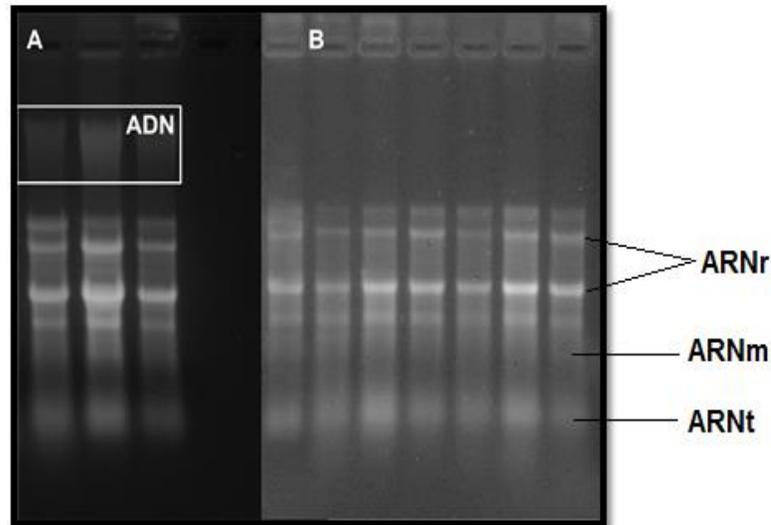


Figura 6. Electroforesis del ARN total en gel de condiciones desnaturalizantes. Muestras de ARN con remanente de ADN (A). Muestras tratadas con ADNasa (B) libres de ADN residual que pueda generar un falso positivo en la aplicación de PCR-TR. ARNr: ARN ribosomal, ARNm: ARN mensajero, ARNt: ARN de transferencia. En todos los carriles se aplicaron 10 µg de ARN total.

Diseño de oligonucleótidos para RT-PCR

Para evaluar la expresión de los genes de interés: glicerol fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), interleucina IL-1 β (*IL-1\beta*), ciclooxygenasa 2 (*COX-2*) y el receptor tipo toll 4, (*TLR-4*), primero se obtuvo la secuencia específica del ARNm de cada gen para *Oryctolagus cuniculus* en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). A partir de cada secuencia del ARNm se diseñaron los oligonucleótidos de anclaje en el programa Primer3 v.0.4.0 (Tabla 1) y se verificó su especificidad (que no formaran estructuras secundarias tipo “orquilla” e hibridación) en el programa Primer Blast de NCBI, Oligo Calc y Oligo Analyzer. La secuencia de oligonucleótidos fue enviada para su síntesis a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, UNAM. Una vez obtenidos los oligonucleótidos, estos se prepararon a una concentración de 100 ng/µl y se mantuvieron a -20°C.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótido de cada gen. F- Oligo 5'→3' cadena de sentido positivo "Forward"; R- Oligo 5'→3' cadena de sentido negativo "Reverse".

Gen	Secuencia de referencia (NCBI)	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplificado
GAPDH	NM_001082253.1	F- TGACGACATCAAGAAGGTGGTG R- GAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC	121 pb
IL-1β	NM_001082201.1	F- TCTGCAACACCTGGGATGAC R- TCAGCTCATACGTGCCAGAC	114 pb
COX-2	NM_001082388.1	F- TTGACCAGTACAAGTGCAGAC R- AGTGCCTAAGGATGTAGTGC	132 pb
TLR-4	NM_001082732.2	F- GTGGTATCTTTTGCTGTAGTT R-TTCTCACCCAGTCCTCATCC	142 pb

Prueba de especificidad de oligonucleótidos

Cuando se obtuvieron los oligonucleótidos, su especificidad se comprobó mediante PCR convencional con ADN genómico de hígado de conejo, verificando que con cada par de oligonucleótidos solo se obtuviera un producto de PCR y que el amplificado tuviese el peso molecular esperado; la verificación de la presencia de una sola banda del peso molecular esperado se realizó mediante una electroforesis de gel de agarosa y buffer TBE (datos no mostrados) (ver apéndice 10.5).

Reacción de transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se hicieron en un equipo StepOnePlus™, con placas de 96 pozos de 0.1 ml (Biosystems) y un sistema comercial de reacciones de SYBR Green (*Power SYBR Green RNA-to-C_T™ 1-Step Kit*). Para conocer la eficiencia de cada par de oligonucleótidos y la cantidad óptima necesaria de ARN a usar para las reacciones de RT-PCR se realizaron curvas de dilución de ARN para cada gen y se obtuvo una curva de disociación y una curva estándar. Las reacciones de RT-PCR de todos los grupos experimentales, se hicieron por triplicado con una concentración de ARN total de 10 ng/ μ l y de cada par de oligonucleótidos de 900 nM, en un volumen final de reacción de 10 μ l. Las condiciones de ciclos térmicos se hicieron de acuerdo a las recomendaciones del

proveedor (Tabla 2), y se obtuvieron los valores de Ct con los que se hicieron los cálculos y análisis de doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Figura 7).

Tabla 2. Perfil térmico. Condiciones de ciclos térmicos usado para reacciones de RT-PCR en tiempo real recomendado por el proveedor.

Etapas	Paso	Temp	Tiempo
Holding	Transcripción inversa	48 °C	30 min
Holding	Activación de AmpliTaq Gold DNA Polimerasa UP (ultra pura)	95 °C	10 min
Cycling (40 ciclos)	Desnaturalizado	95 °C	15 sec
	Alineación/Amplificado	60 °C	1 min
Curva de fusión (Melt curve) *Opcional	Desnaturalizado	95 °C	15 sec
	Alineación	60 °C	15 sec
	Desnaturalizado	95 °C	15 sec

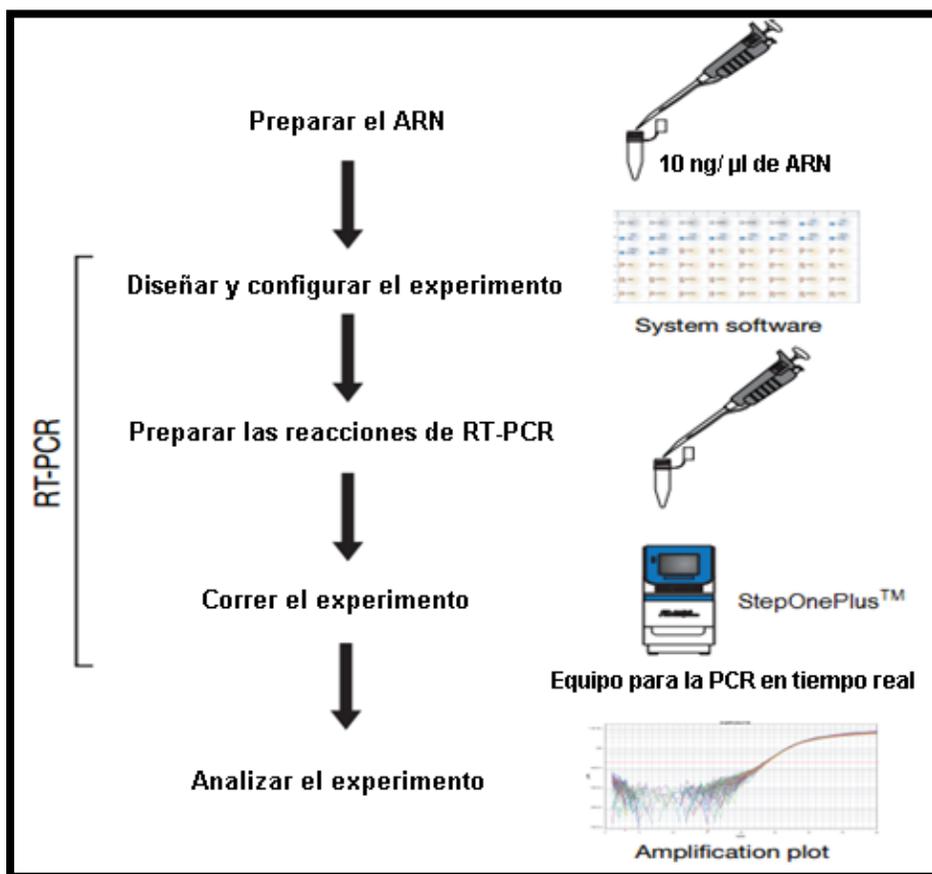


Figura 7. Representación de la metodología empleada para los RT-PCR Tiempo Real.

6. RESULTADOS

6.1 Masa corporal

Los conejos se pesaron cada mes para verificar si hubo un aumento en la masa corporal (peso) que indicara sobrepeso en los conejos jóvenes alimentados con la dieta enriquecida con 20% de ácido palmítico. En el primer mes todos los grupos pesaron en promedio 2 kg. Para el segundo mes hubo un incremento aproximado de 1 kg en todos los grupos. En el tercer mes el grupo ácido palmítico/ácido acetil salicílico (AP/AAS) presentó el mayor peso con 4.14 kg, mientras que el menor peso fue en el grupo control (CN) con 3.5 kg. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre ellos. La ganancia promedio total de peso al tercer mes en los grupos fue de aproximadamente 2 kg, todos estos datos son mostrados en la figura 8.

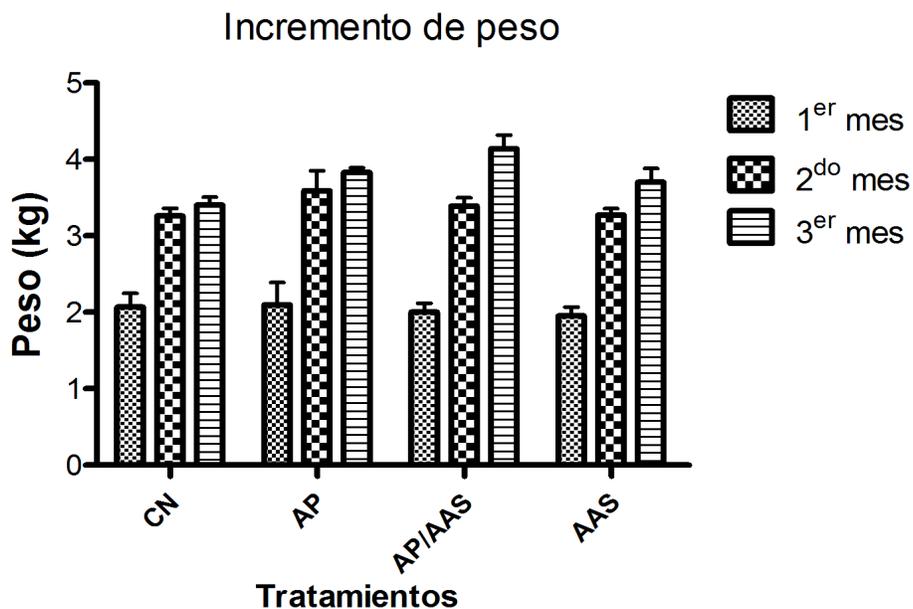


Figura 8: Ganancia de peso a través del tiempo. En el primer mes el promedio de peso es similar entre los grupos (aprox. 2 Kg). Al segundo mes aumentó 1 kg en todos los grupos y al tercer mes el grupo con mayor peso fue AP/AAS seguido de AP. Los resultados son expresados como media \pm SEM, (n=5).

6.2 Química sanguínea

6.2.1 Metabolismo de carbohidratos

Para conocer el metabolismo de carbohidratos en los grupos experimentales se realizó la cuantificación mensual de la concentración sérica de glucosa e insulina, durante tres meses. Las concentraciones más altas de glucosa se observaron en el tercer mes en el grupo AP con 98.75 mg/dL (Figura 9, panel A). Además de esto, en el segundo mes se observó una ligera disminución en la concentración de glucosa, por el contrario, en el tercer mes, esta concentración aumentó en los tratamientos AP y AP/AAS (Figura 9, panel B).

Estos resultados son similares a la concentración de insulina, ya que se observó nuevamente una disminución de su concentración sérica en todos los grupos a partir del segundo mes. El grupo ácido acetilsalicílico (AAS) presentó la mayor concentración de insulina durante el primer y segundo mes con 5.84 y 1.61 mg/dL respectivamente, aunque en el tercer mes disminuyó su concentración a 0.73 mg/dL, siendo AP/AAS en este mes el que presentó la mayor concentración (1.36 mg/dL) (Figura 9, panel B).

De acuerdo a las mediciones obtenidas y al análisis estadístico de prueba *t* de Student, no se encontró ningún cambio significativo en la concentración sérica de glucosa e insulina en ningún grupo experimental con respecto al grupo control (CN).

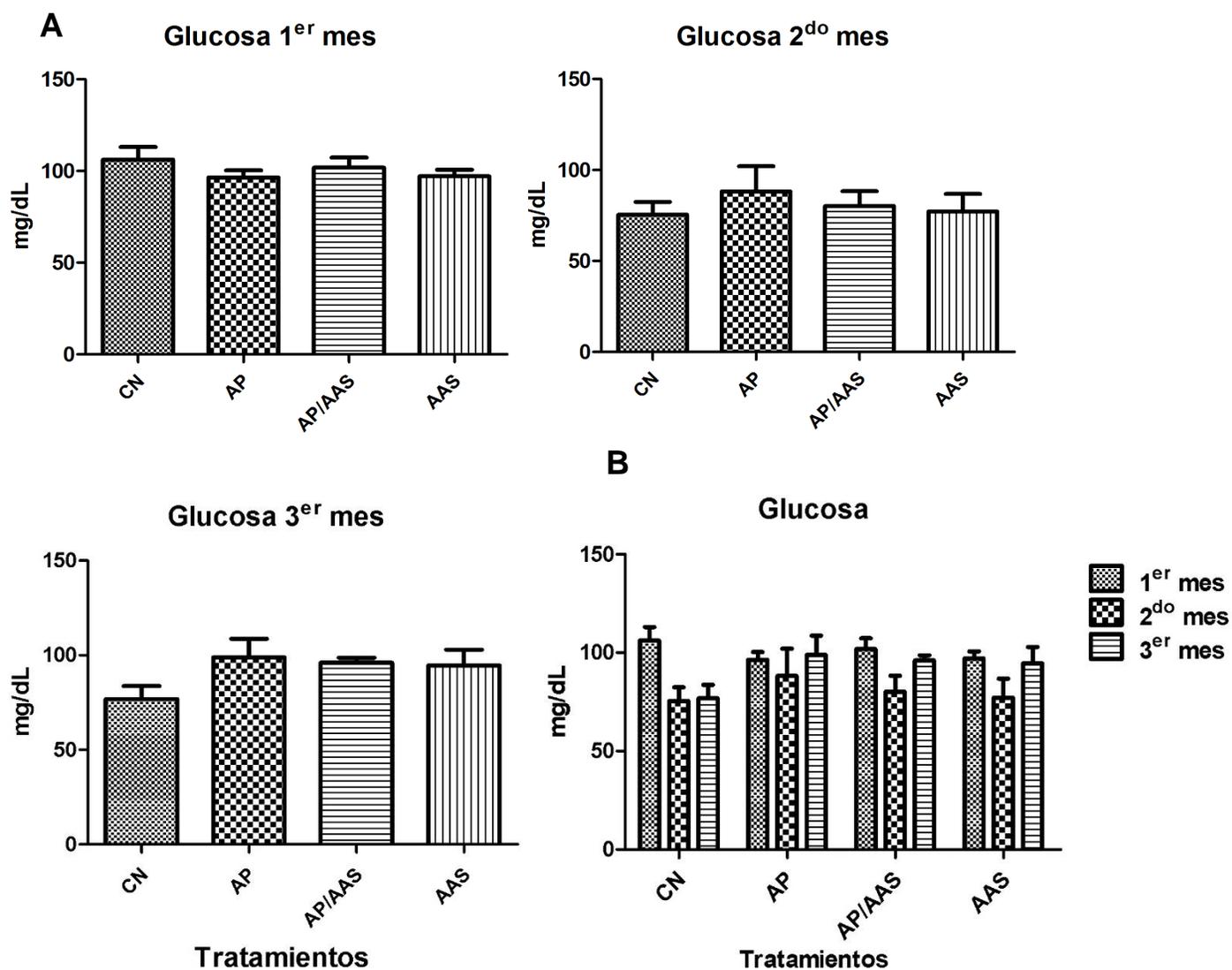


Figura 9. Química sanguínea de carbohidratos. Concentración de glucosa sérica en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de glucosa a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5).

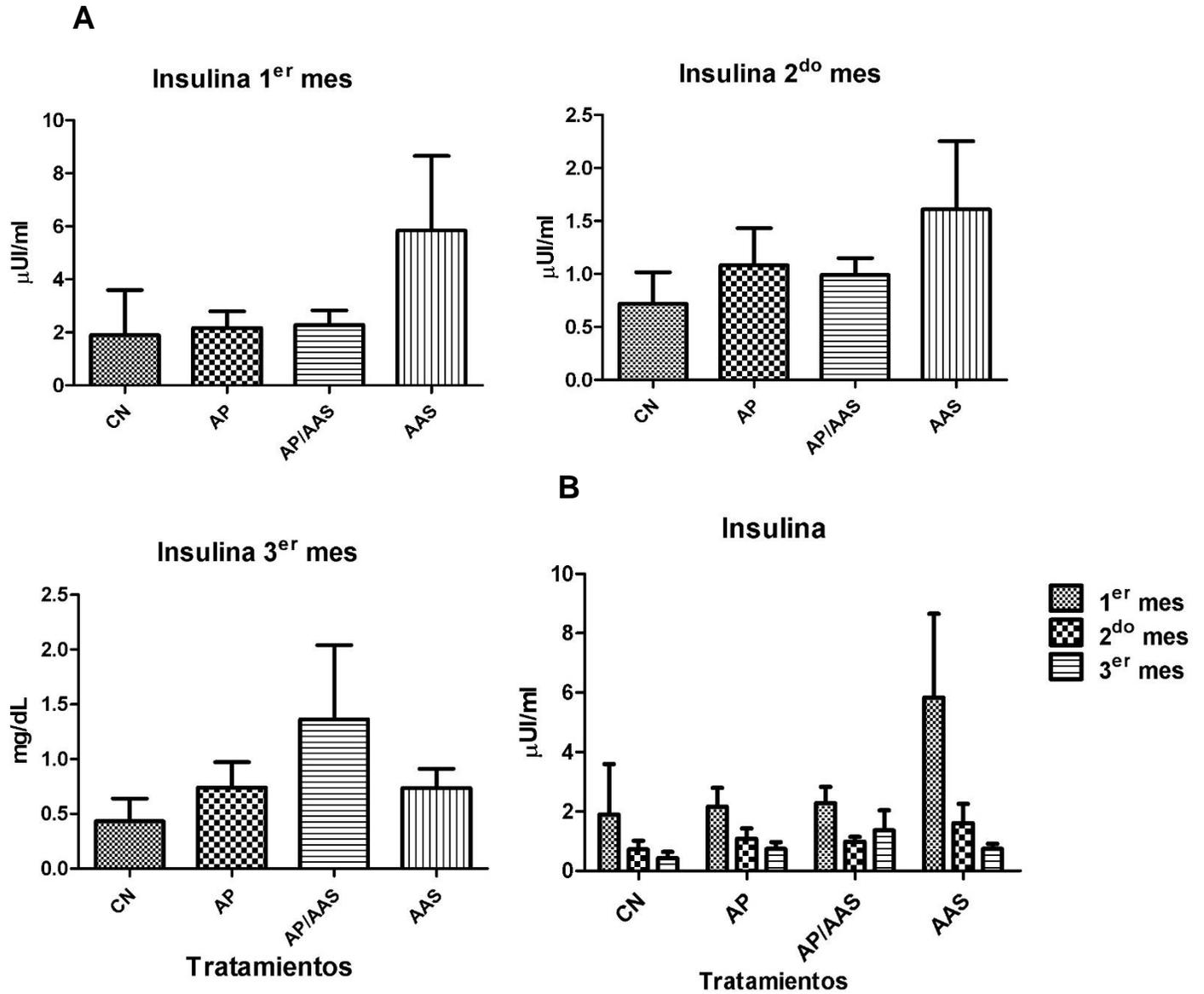


Figura 10. Química sanguínea de carbohidratos. Concentración de insulina en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de insulina a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5).

6.2.2 Perfil lipídico

Para conocer el metabolismo de lípidos, mensualmente se midió colesterol total, triglicéridos (TG), lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL). Los datos fueron analizados con la prueba estadística *t* de Student y se obtuvieron los siguientes resultados:

Colesterol total:

En la medición de colesterol total en el primer mes el grupo AP presentó la mayor concentración (98.8 mg/dL), y en el segundo mes la mayor concentración promedio se fue en AP y AP/AAS (76.8 mg/dL y 78.6 mg/dL respectivamente). Sin embargo, en estos meses no se encontraron diferencias significativas. En el tercer mes AP/AAS mostró la mayor concentración con 76.8 mg/dL, aunado a esto también presentó diferencias significativas ($P = 0.0268$) con respecto a la concentración de colesterol total del grupo AAS (42 mg/dL) (Figura 11, panel A). Es importante mencionar que durante los tres meses que se midió colesterol total se observó una ligera disminución en la concentración de éste del primer hasta el tercer mes en todos los tratamientos (Figura 11, panel B).

Triacilglicéridos:

En el primer mes la mayor concentración de TG fue en el grupo AP con 221.2 mg/dL. Posteriormente, en el segundo mes AP y AP/AAS tuvieron la concentración de TG más alta con 169.8 y 166.2 mg/dL respectivamente, mientras que en el grupo CN y AAS obtuvieron las menores concentraciones (68.8 mg/dL y 95.2 mg/dL), además se presentaron diferencias significativas entre el CN y AP ($P = 0.0395$). En el tercer mes nuevamente la concentración más elevada fue en AP con 162.5 mg/dL y se observó diferencias con respecto al grupo CN ($P = 0.0465$) y AP/AAS vs AAS ($P = 0.0120$) (Figura 12, panel A). Por último, durante los tres meses que se midió los TG se observó una ligera disminución en su concentración desde del primer hasta el tercer mes en todos los tratamientos (Figura 12, panel B).

LDL:

En las mediciones de la lipoproteína de baja densidad en el primer y segundo mes la máxima concentración promedio correspondió al grupo AP con de 38.4 mg/dL en el primer mes y 32.2 mg/dL en el segundo. Sin embargo, no se presentaron diferencias. En el tercer mes nuevamente la mayor concentración se presentó en AP con 30.75 mg/dL seguido de AP/AAS (27.8 mg/dL). Aunado a esto, se mostró una diferencia significativa entre AP/AAS vs AAS ($P = 0.0134$) (Figura 13, panel A). Además, se observó una clara disminución de LDL sérico en el grupo CN y AAS a través de los meses (Figura 13, panel B).

HDL:

En el caso de la lipoproteína de alta densidad en el primer mes no se observaron cambios importantes en su concentración. En contraste, en el segundo mes el grupo AP/AAS tuvo la mayor concentración con 47.4 mg/dL, y se presentaron diferencias significativas ($P = 0.0290$) con respecto a la concentración del grupo AAS que fue de 31.4 mg/dL. Aunque para el tercer mes, nuevamente no se observan diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, el grupo con la menor concentración de HDL fue AP con 31.25 mg/dL, seguido de AAS (32.2 mg/dL) (Figura 14, panel A). Por último, se encontró un incremento de HDL sérico en el grupo CN, AP/AAS y AAS a través de los meses (Figura 14, panel B).

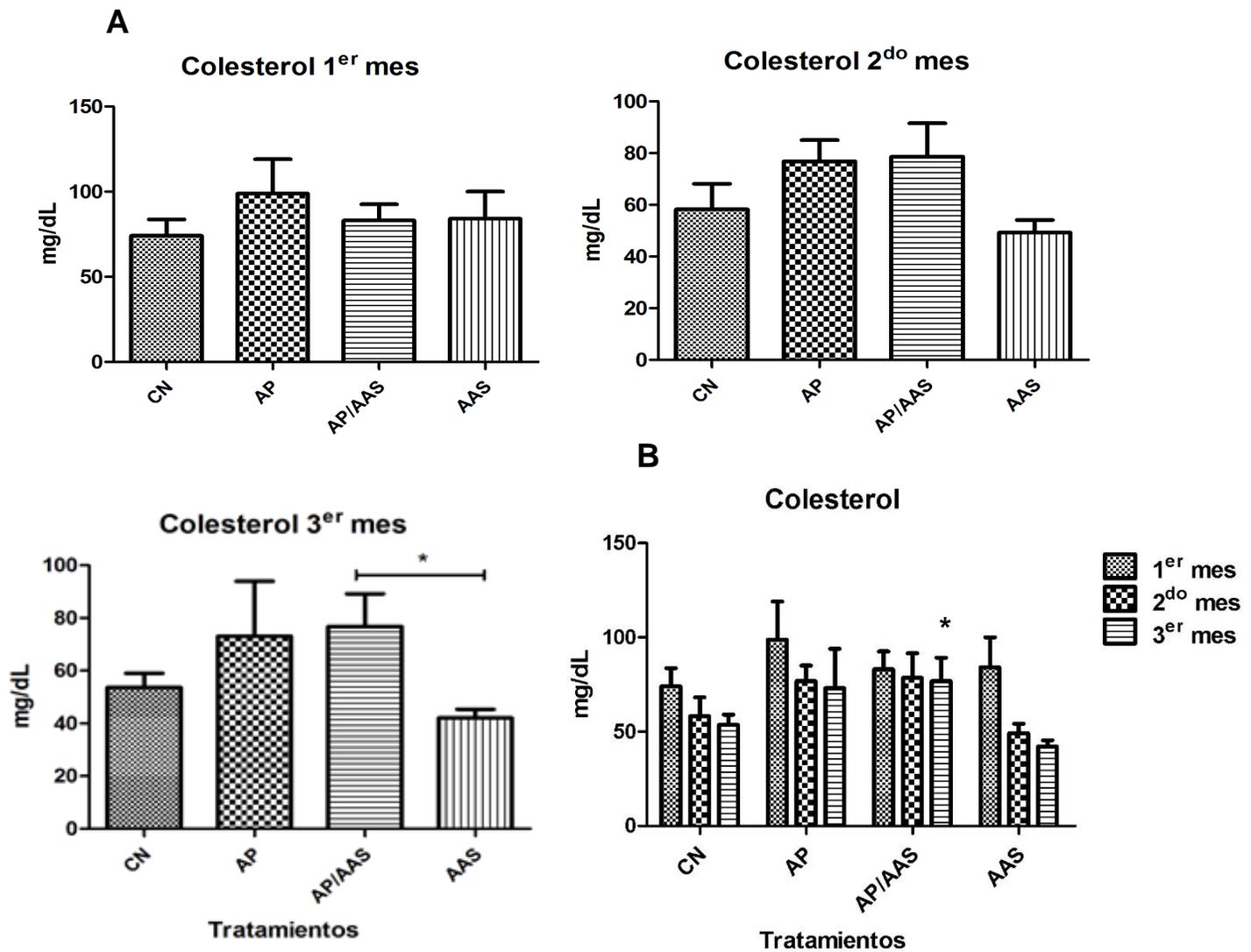


Figura 11. Perfil lipídico. Química sanguínea: colesterol. Concentración de colesterol en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de colesterol a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM * $P < 0.05$ ($n=5$).

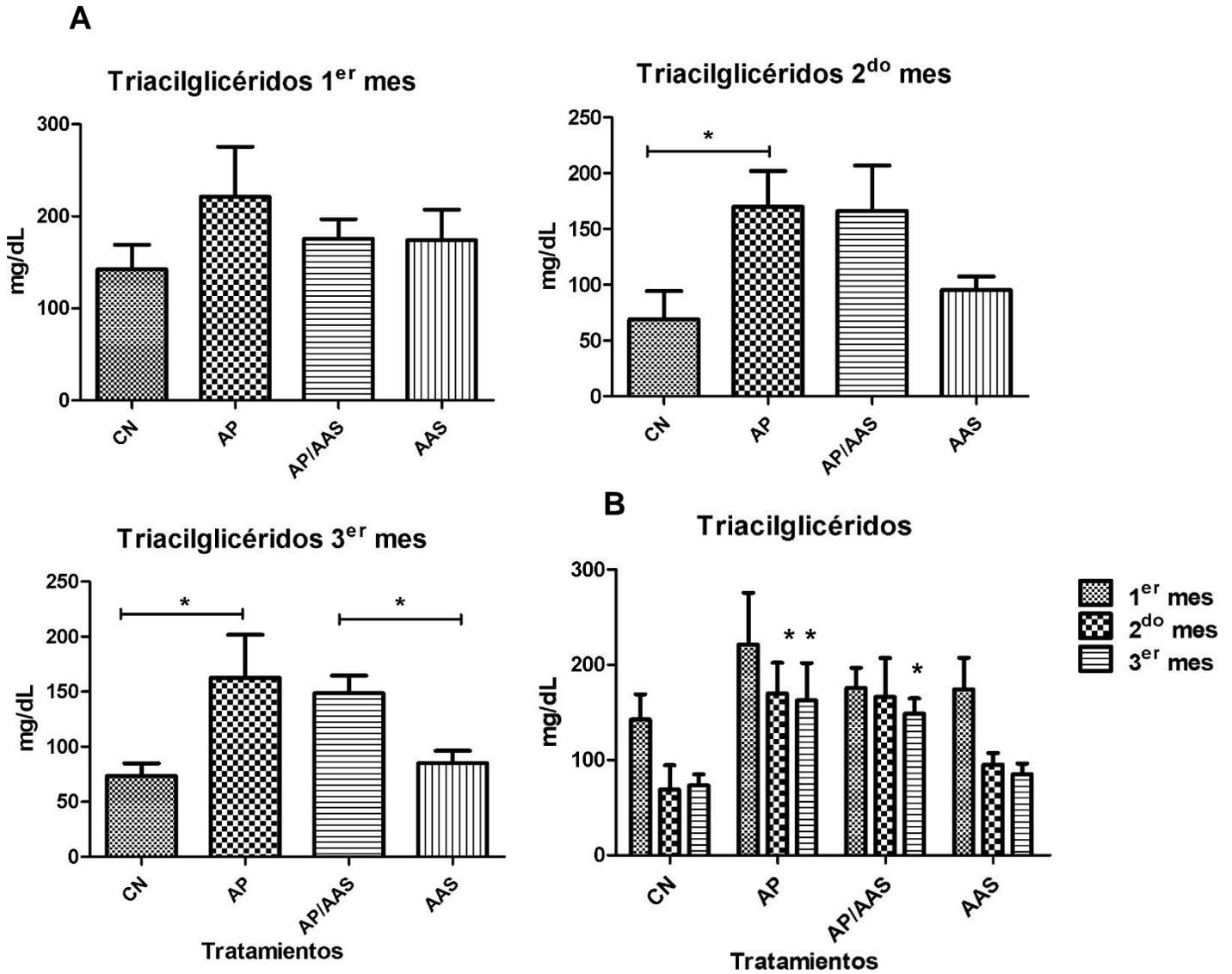


Figura 12. Perfil lipídico. Química sanguínea: Triacilglicéridos. Concentración de TG en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de TG a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM * $P < 0.05$ ($n=5$).

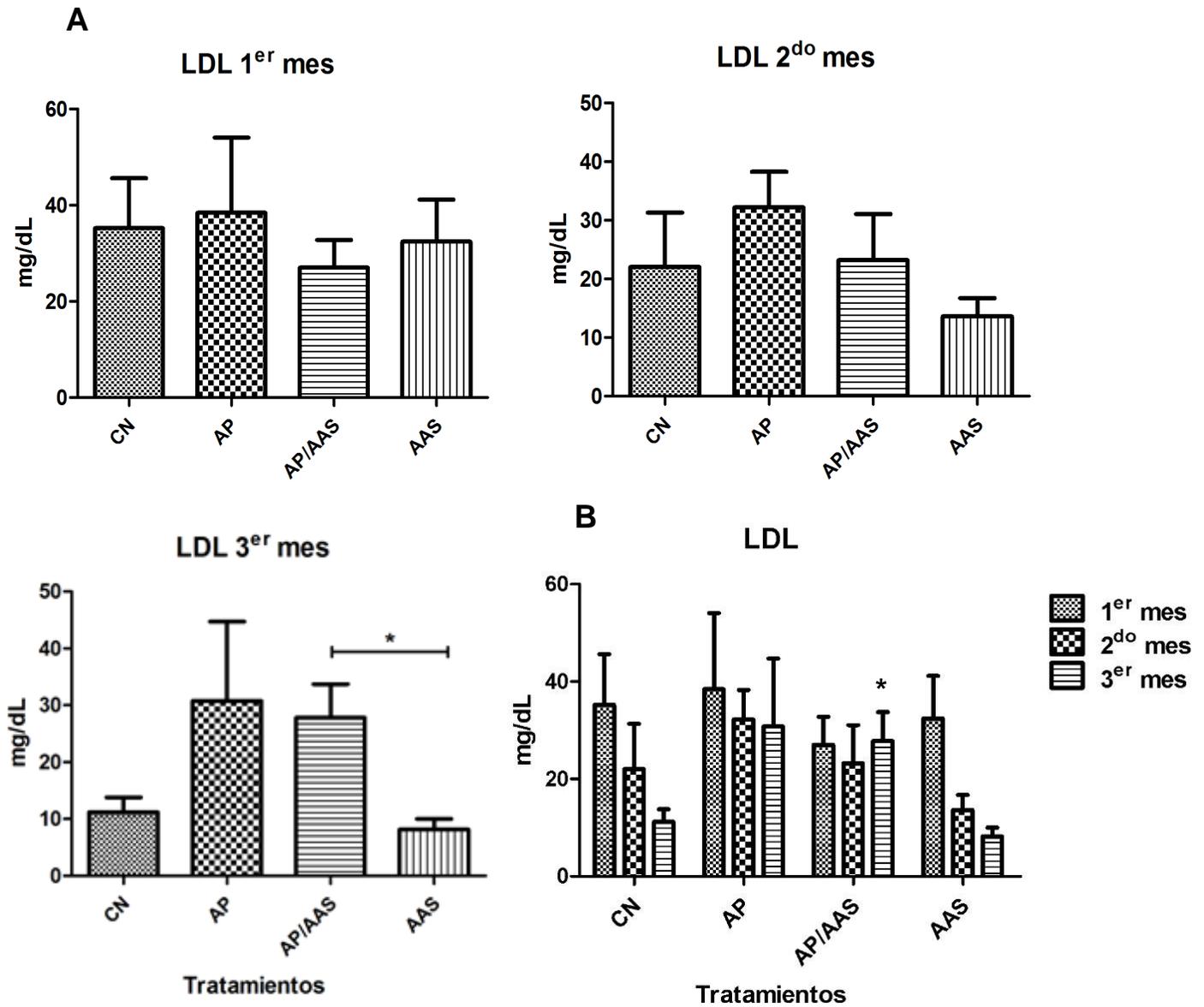


Figura 13. Perfil lipídico. Química sanguínea: LDL. Concentración de LDL en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de LDL a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * $P < 0.05$.

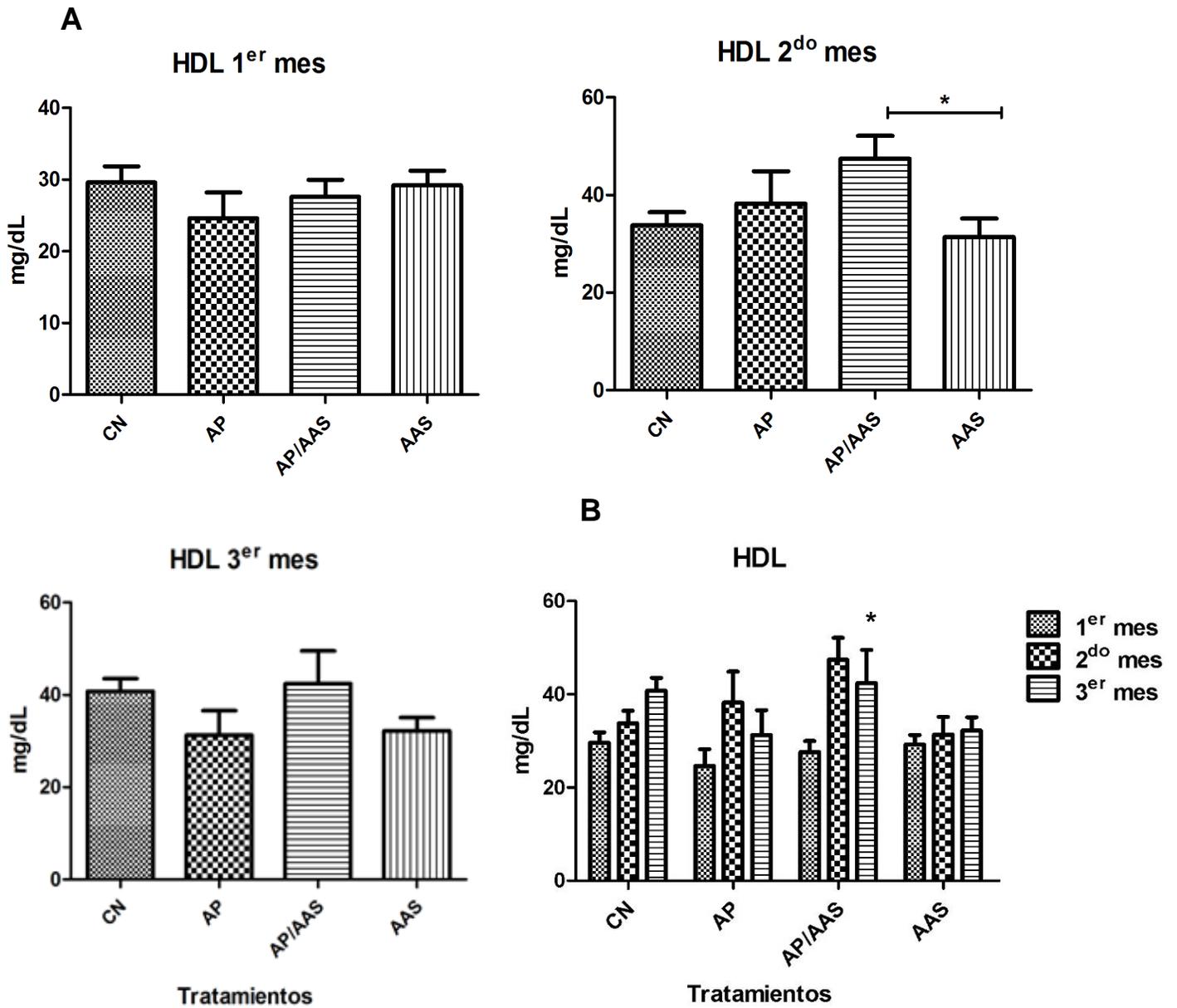


Figura 14. Perfil lipídico. Química sanguínea: HDL. Concentración de HDL en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de HDL a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * $P < 0.05$.

6.2.3 Función hepática

Para detectar anomalías en la función hepática asociadas a la ingesta de una dieta alta en grasa, se realizó la medición durante tres meses de la concentración sérica de las enzimas: TGO, TGP, GGT, FA y LDH. Las concentraciones son presentadas en Unidades/Litro (U/L).

Aminotransferasa de aspartato y alanina (TGO, TGP): Durante el primer mes no se observaron diferencias entre los grupos para ambas enzimas. En el segundo mes se encontraron diferencias en la concentración promedio de TGO entre el grupo CN y AP ($P = 0.044$) (Figura 15), mientras que TGP presentó una diferencia de concentración entre AP/AAS y AAS ($P = 0.479$) en este mismo mes (Fig. 16, panel A). Sin embargo, esto no se repitió en el tercer mes, pero la mayor concentración de TGO correspondió al grupo AP (56.25 U/L), mientras que la menor fue en AP/AAS de 34 U/L (Figura 15). En el caso de la TGP las menores concentraciones siempre correspondieron al grupo AP y AP/AAS hasta el tercer mes (Fig. 16, panel B). En el tercer mes el grupo AAS tuvo la máxima concentración con 85.8 U/L y fue estadísticamente diferente con respecto a FAT/AAS ($P = 0.0181$) que fue el grupo con menor concentración de TGP con 35.4 U/L (Fig. 16, panel A).

Gama glutamiltranspeptidasa (GGT): Para la GGT no hubo cambios significativos en su concentración entre los grupos a través del tiempo en los cuales se realizaron las mediciones, solo en el segundo mes las menores concentraciones correspondieron a AP/AAS y AAS con 8 U/L y 5.25 U/L respectivamente. En el tercer mes los valores de concentración obtenidos entre los grupos fueron casi homogéneos (en promedio 9 U/L) (Figura 17).

Fosfatasa alcalina (FA): No se observaron cambios significativos en la concentración sérica de FA entre los grupos en ningún mes, incluso se notó una homogeneidad de las concentraciones de FA entre los tratamientos en cada mes (Figura 18, panel A). Sin embargo, en el primer mes se presentaron las mayores concentraciones séricas de esta enzima en todos los grupos y posteriormente esta disminuyó durante el segundo y tercer mes (Figura 18, panel B).

Lactato deshidrogenasa (LDH): En el primer mes no se presentaron diferencias significativas en cuanto a su concentración, pero la máxima concentración se presentó en AP con 498.6 U/L. En el segundo mes nuevamente el grupo AP presento la máxima concentración, además de mostrar diferencias significativas con el grupo CN ($P = 0.0147$). En el tercer mes, nuevamente no se presentaron diferencias, y la mínima concentración correspondió al grupo AP/AAS con 314.6 U/L (Figura 19, panel A). Los valores de concentración sérica de esta enzima fluctuaron entre los grupos y a través del tiempo (Figura 19, panel B).

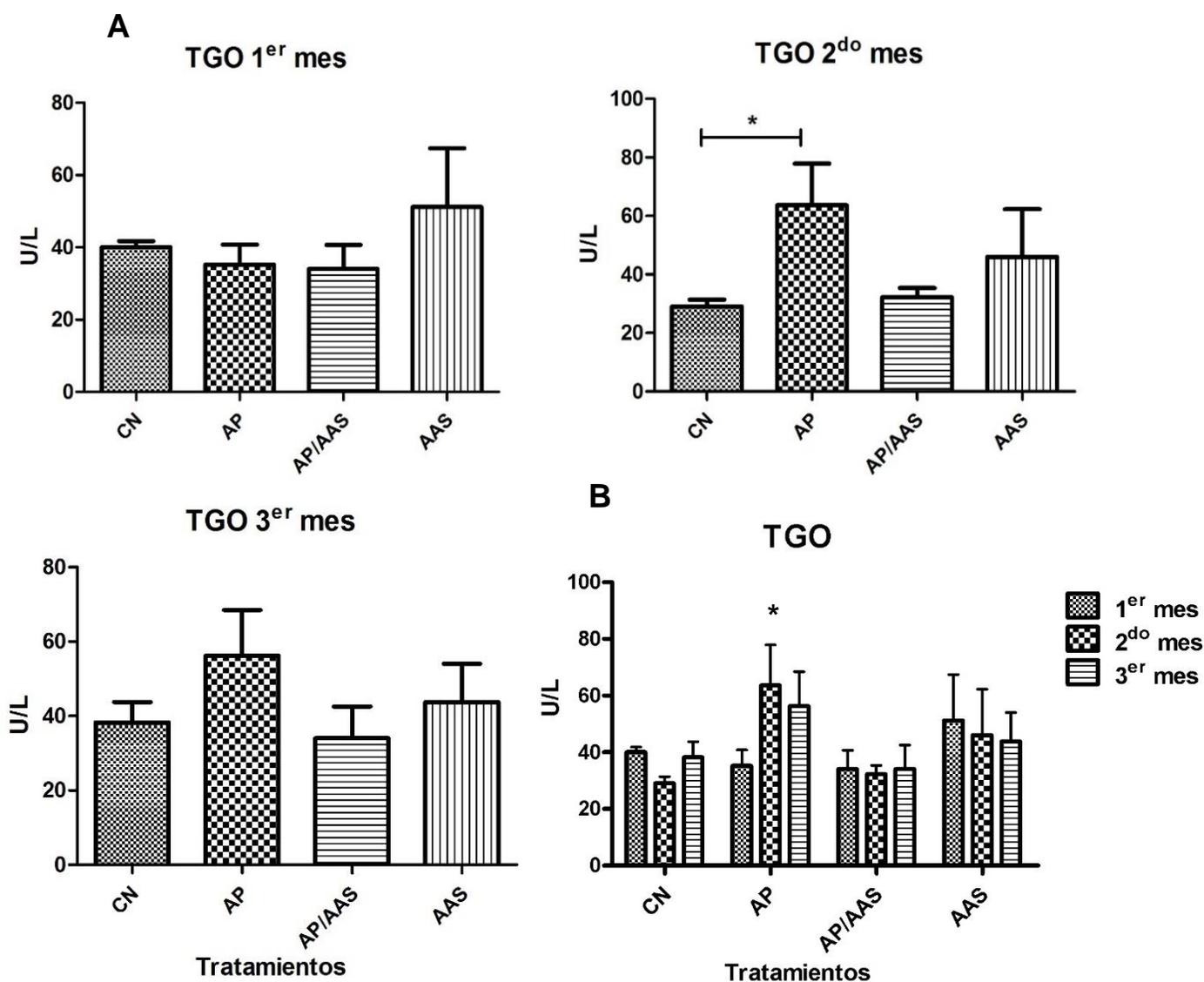


Figura 15: Enzimas indicadoras de la función hepática: TGO. Concentración de TGO en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de TGO a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM ($n=5$) * $P < 0.05$.

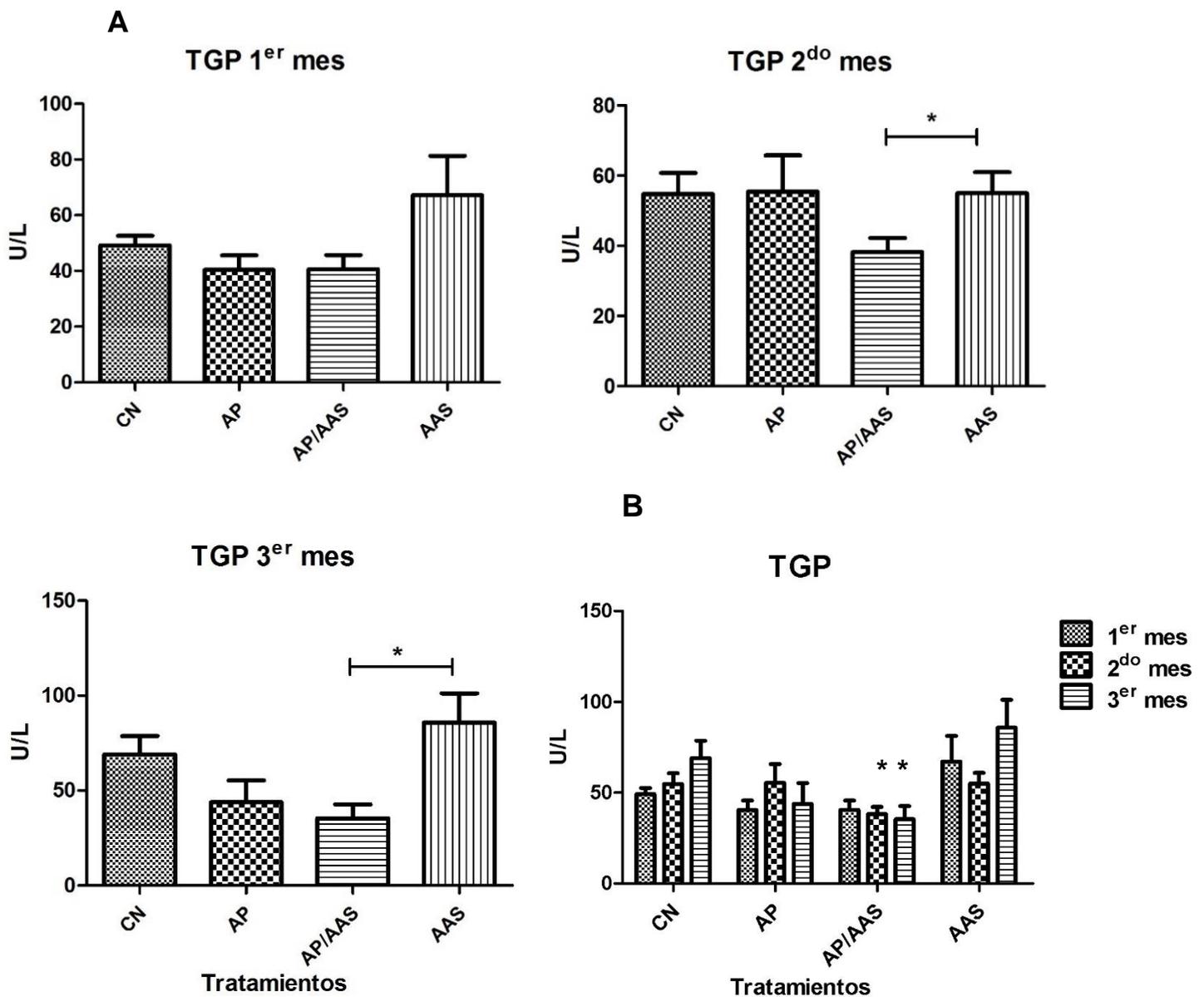


Figura 16: Enzimas indicadoras de la función hepática: TGP. Concentración de TGP en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de TGP a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * P < 0.05.

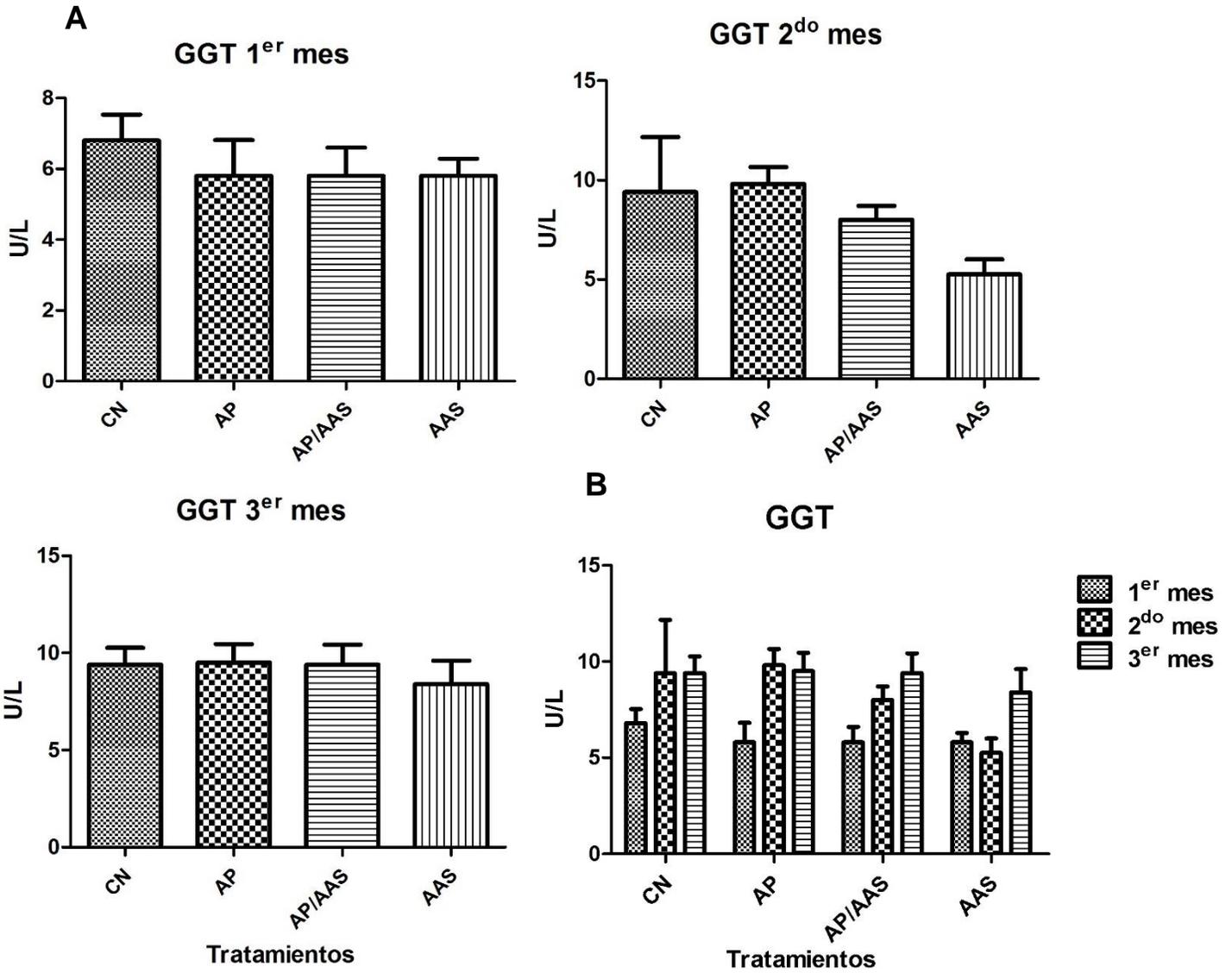


Figura 17: Enzimas indicadoras de la función hepática: GGT. Concentración de GGT en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de GGT a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * $P < 0.05$.

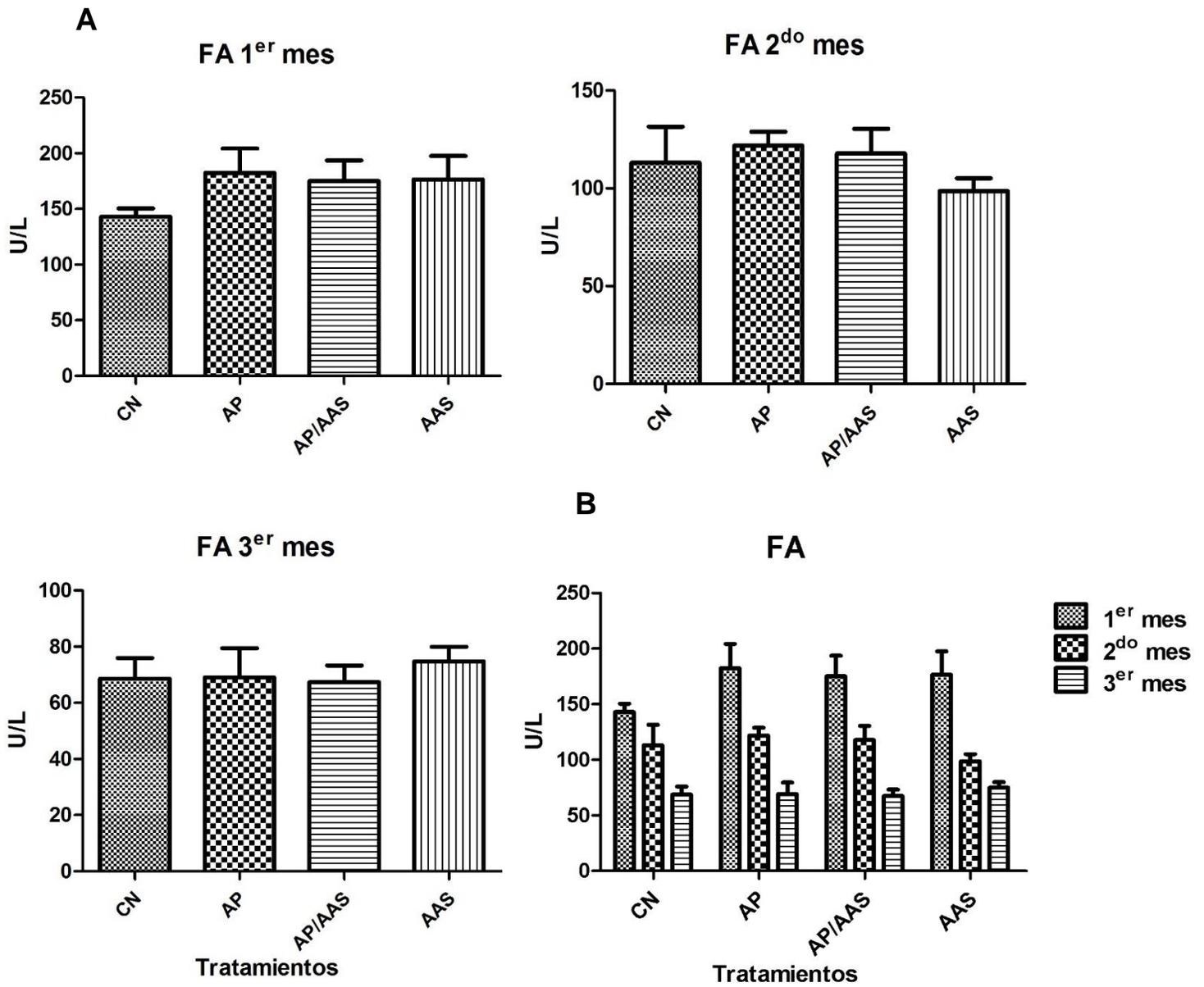


Figura 18: Enzimas indicadoras de la función hepática: FA. Concentración de FA en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de FA a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * $P < 0.05$.

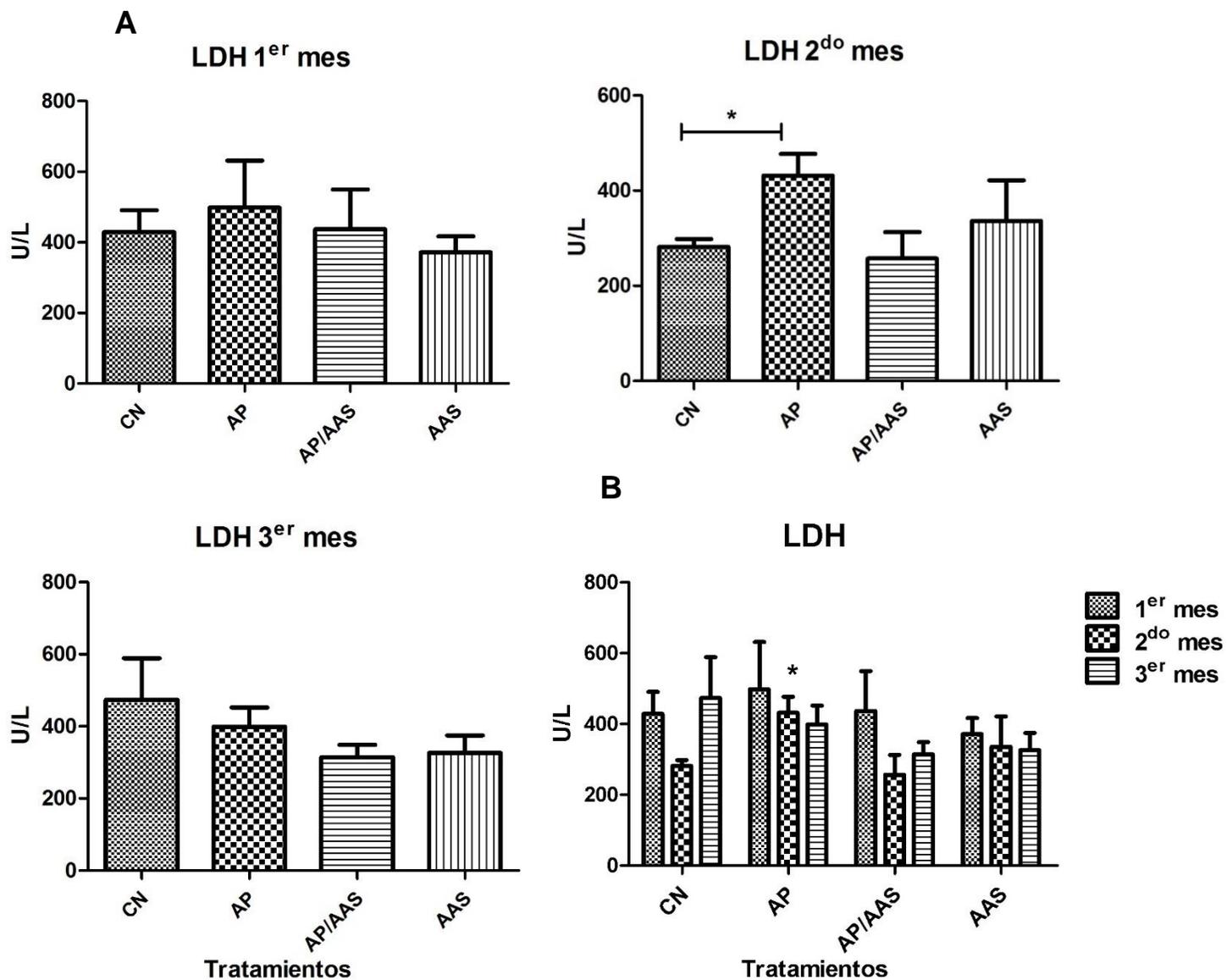


Figura 19: Enzimas indicadoras de la función hepática: LDH. Concentración de LDH en los tratamientos de cada mes (A). Relación de la concentración de LDH a través del tiempo (B). Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5) * $P < 0.05$.

6.3 Producción total de especies reactivas de oxígeno (ERO) en hígado

En la evaluación de la producción total de ERO con el uso de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), se encontró en las series de tiempo de 60 min de la medición de fluorescencia, que la mayor producción de ERO fue en el grupo AP, este resultado fue semejante a la producción del grupo AAS; en contraste, el grupo AP/AAS tuvo una menor producción de ERO con respecto a estos dos grupos (Figura 12, panel A). De las series de tiempo de la producción de ERO al minuto 60 se cuantificó proteínas totales y se obtuvo la relación de unidades de fluorescencia por mg de proteínas (Figura 12, panel B). Sin embargo, aunque se observó una producción diferencial de ERO entre los grupos, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 20).

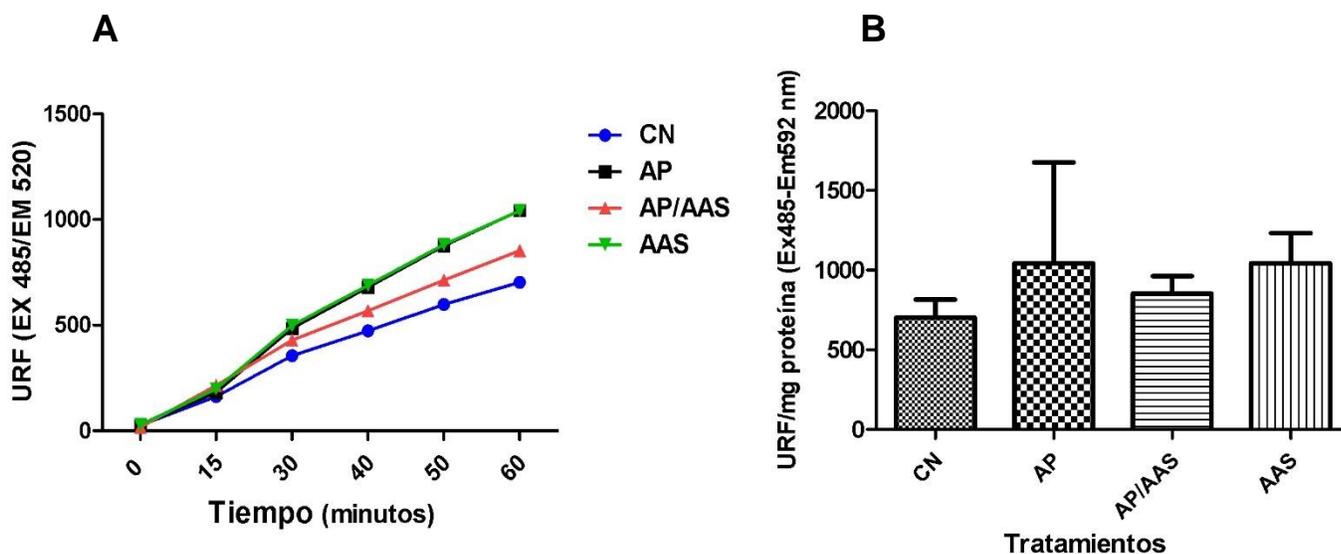


Figura 20. Producción de ERO totales. Serie de tiempo de la reacción de DCFDA con el extracto celular de hígado de conejo (A). Las unidades de fluorescencia relativa son expresadas por mg de proteína total que se cuantificó por muestra (B). La medición son el promedio de dos lecturas por muestra, y los resultados son expresados como media \pm SEM (AP n=2; los demás grupos n=3).

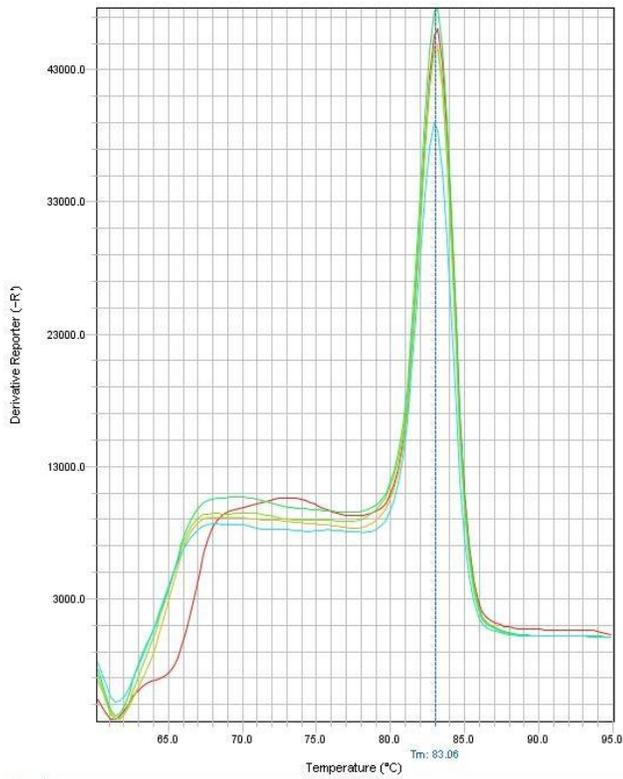
6.4 Reacción de transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

6.4.1 Eficiencia de cada par de oligonucleótidos

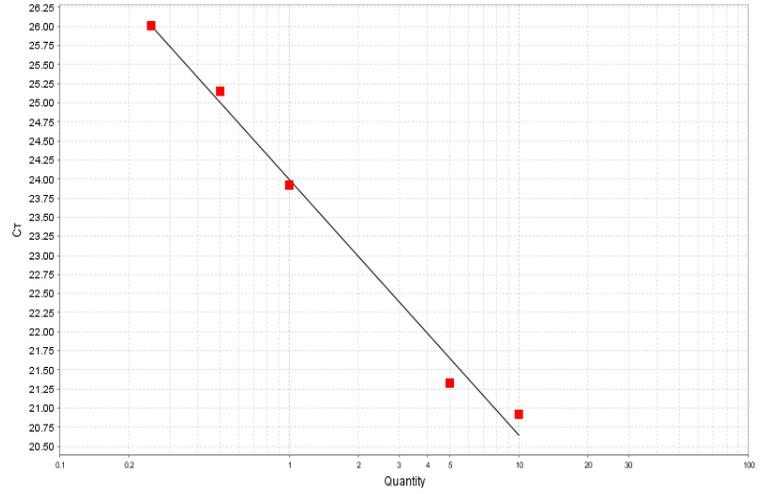
Para conocer la eficiencia de cada par de oligonucleótidos de los genes que se emplearon en este trabajo se realizaron curvas de dilución de la concentración del ARN total y se obtuvo la curva de fusión (“Melt curve”) y la curva estándar. La curva de fusión se obtuvo mediante las curvas de disociación y permitió de manera gráfica evaluar si los oligonucleótidos diseñados eran específicos para la secuencia de un solo gen, pues se esperaba que dicho gen generara un solo producto del amplificado. Al finalizar el RT-PCR, todos los productos de amplificación fueron del mismo tamaño, y por tanto, de manera gráfica se observó un solo pico que correspondió a la temperatura única en donde la mayor parte del producto amplificado se separó, de no haber presentado un solo pico en el gráfico, se hubiera interpretado como la formación de productos inespecíficos o dímeros, es decir, los oligonucleótidos podrían haber reconocido una secuencia diferente a la del gen de interés o bien que hubieran estado uniéndose entre sí (Rodríguez & Rodríguez, 2006).

Con la curva estándar se calculó la eficiencia de la amplificación mediante la pendiente de la recta de regresión en la curva estándar. Un valor cercano a -3,3 indicaba una eficiencia de amplificación de la PCR óptima. Por otra parte, el valor de R^2 (coeficiente de correlación) mide la proximidad del ajuste entre la recta de regresión y los puntos de datos C_t individuales de las reacciones estándar, por ello un valor óptimo de R^2 debe ser >0.99 . En la figura 21 se muestran las curvas de fusión y curva estándar de los genes utilizados: *GAPDH*, *TLR-4*, *IL-1 β* y *COX-2* que mostraron un solo pico que indica la temperatura única en donde la mayor parte del producto amplificado se separó.

A: GAPDH Melt Curve

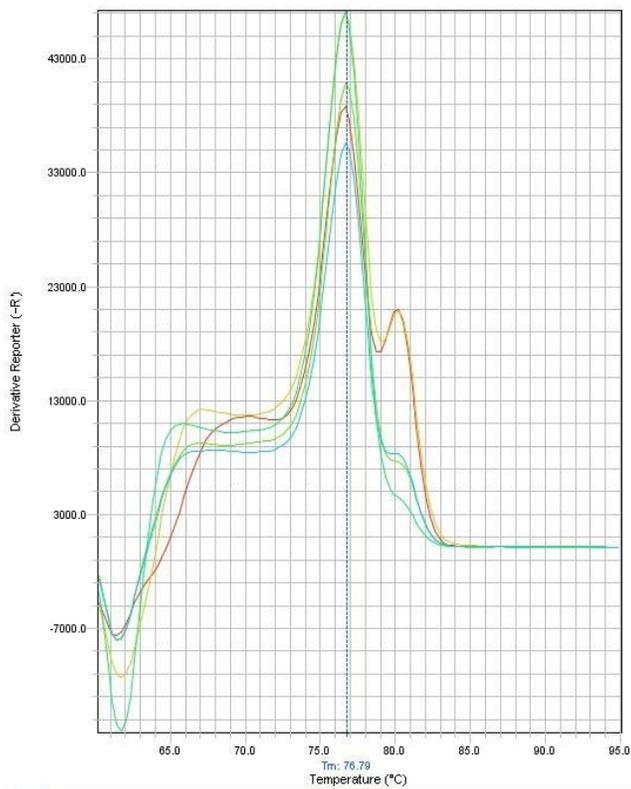


Standard Curve

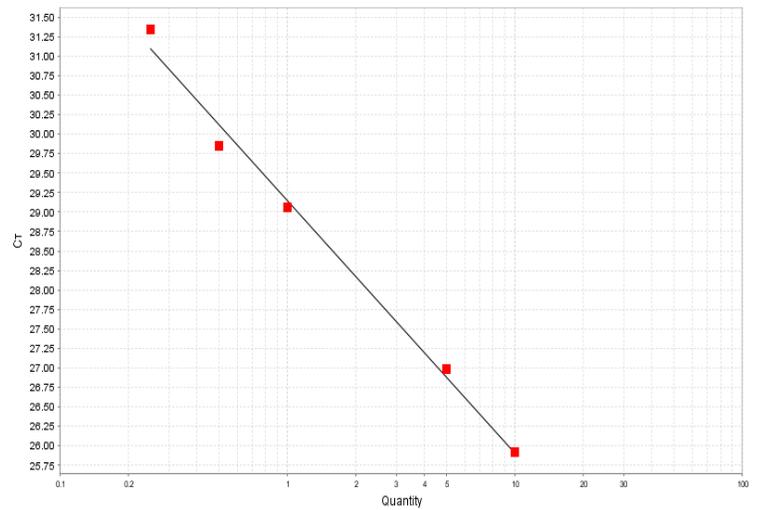


Target: GAPDH Slope: -3.348 Y-Inter: 23.997 $R^2: 0.99$ Eff: 98.94

B: TLR-4 Melt Curve



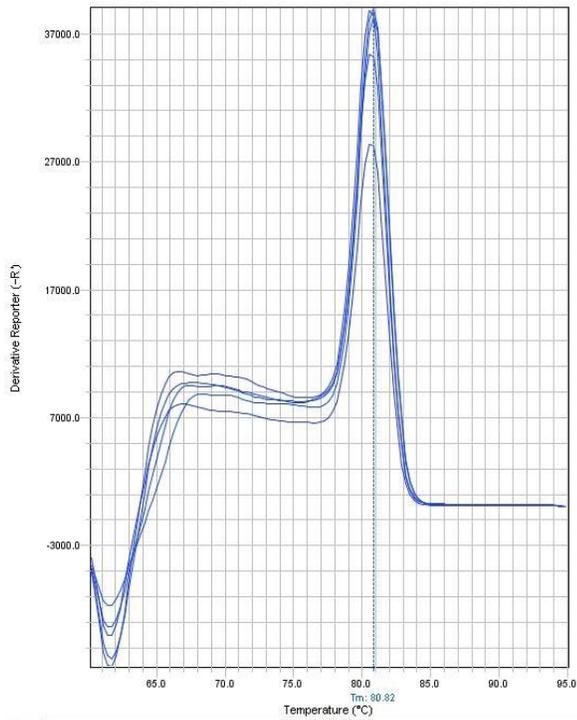
Standard Curve



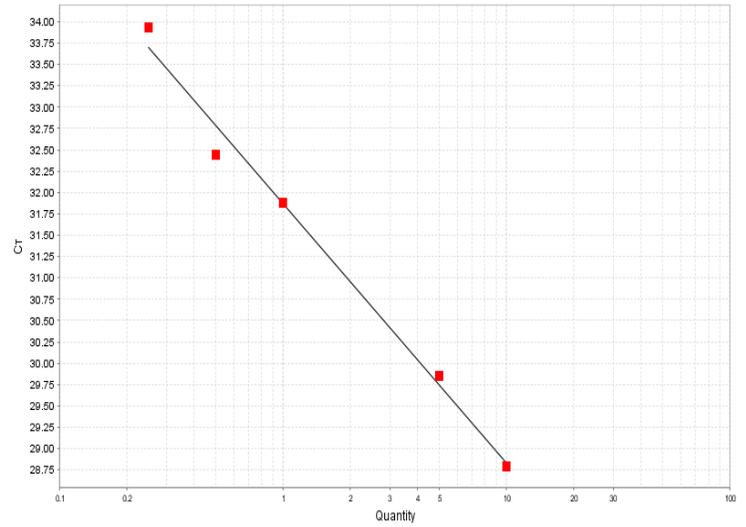
Target: TLR4 Slope: -3.233 Y-Inter: 29.144 $R^2: 0.992$ Eff: 103.845

C: IL-1 β

Melt Curve



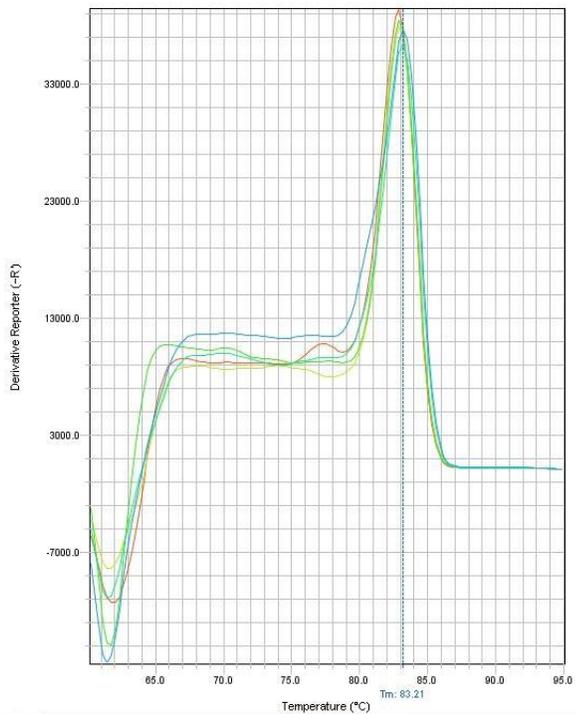
Standard Curve



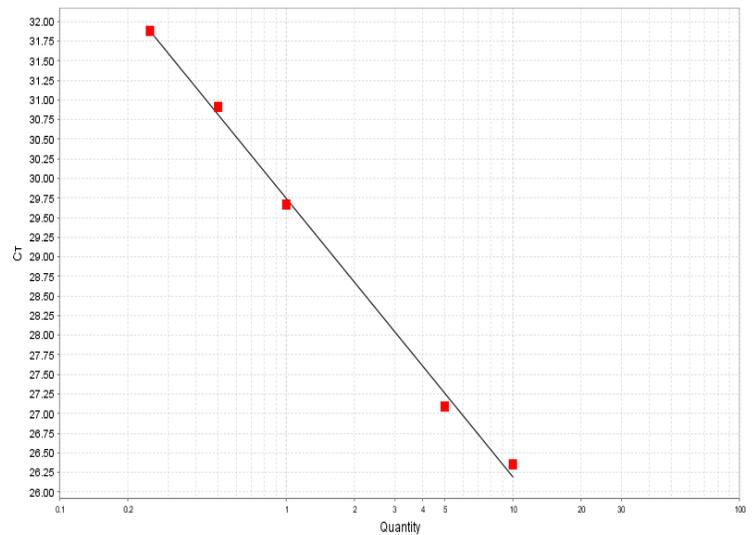
Target: IL1B Slope: -3.037 Y-Inter: 31.864 R²: 0.989 Eff%: 113.449

D: COX-2

Melt Curve



Standard Curve



Target: COX2 Slope: -3.547 Y-Inter: 29.745 R²: 0.997 Eff%: 91.408

Figura 21. Curva de fusión (“Melt curve”) y curva estándar. Para todos los genes se realizó una curva de diluciones con RNA total (5 diluciones). Gen constitutivo *GAPDH* (A). Gen de receptor de membrana tipo toll 4 (*TLR-4*) (B). Gen interleucina 1B (*IL-1B*) (C). Gen de ciclooxigenasa 2 (*COX-2*) (D).

6.4.2 Expresión genética diferencial

Para calcular la expresión relativa de cada gen, se usó el método de *Doble delta Ct* ($\Delta\Delta Ct$), con este se compararon directamente los valores de Ct del gen de interés y del gen de referencia de cada muestra, y posteriormente se compararon los Ct de la muestra experimental con respecto a la muestra control mediante la normalización de estos datos con el gen de referencia (GAPDH). De acuerdo a este método se encontró que la expresión de los genes *IL-1B* y *COX-2* en todos los tratamientos fue menor (<1) con respecto al control, es decir, el nivel del transcrito para dichos genes no fue mayor al del gen constitutivo (GAPDH) y, por tanto, no se encontró una expresión diferencial entre los grupos experimentales. En contraste, la expresión del gen *TLR-4* incrementó en el grupo AP pues fue 6.22 veces más que el grupo CN, seguido del grupo AAS con 4 veces más que el CN y en AP/AAS la expresión de *TLR-4* aumentó 1.7 veces más con respecto al control (Figura 22).

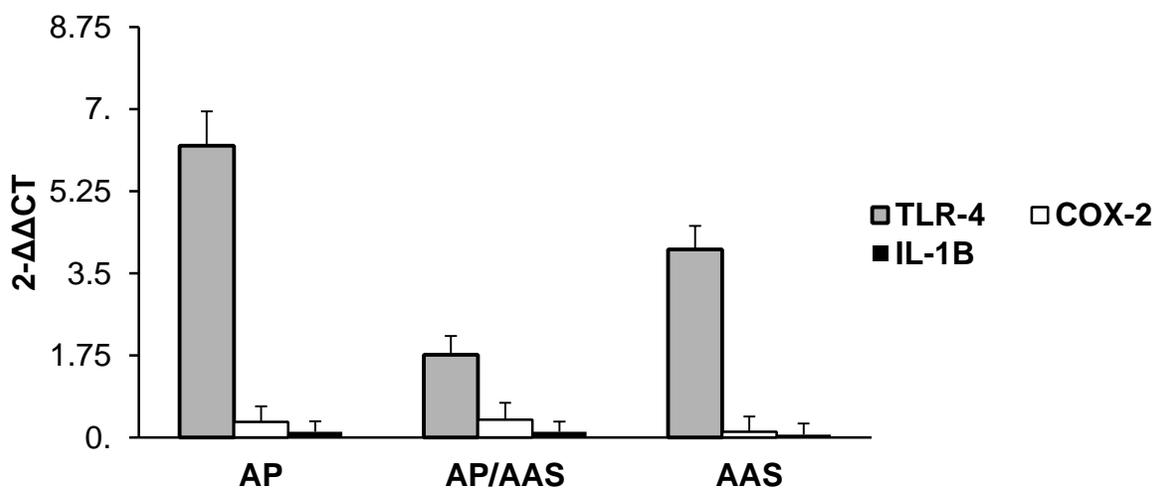


Figura 22. Niveles relativos del ARN mensajero de tres genes indicadores de inflamación mediante $\Delta\Delta Ct$. La expresión genética se evaluó en muestras de hígado de conejos alimentados con ácido palmítico al 20% (AP), con ácido palmítico + ácido acetilsalicílico (AP/AAS) y con dieta normal + ácido acetilsalicílico (AAS). Para cada gen los niveles de expresión de los conejos alimentados con la dieta normal (CN) se tomaron como valor de referencia. Los datos se presentan como el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y su coeficiente de variación de seis mediciones por gen para dos conejos por tratamiento.

7. DISCUSIÓN

7.1 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y función hepática

En el modelo de conejos jóvenes alimentados con una dieta alta en grasa se observó que, al tercer mes todos los grupos habían aumentado en promedio 2 kilogramos (Figura 8), pero con una diferencia del valor promedio de aquellos animales alimentados con dieta alta en grasa AP y AP/AAS de 3.83 kg y 4.14 kg respectivamente. Sin embargo, pese a este incremento de peso, no se demostró un aumento significativo entre los grupos. Estos resultados son semejantes a los reportados por Chen y colaboradores (2013), quienes en conejos alimentados por dos meses con una dieta alta en grasa (adicionada con colesterol, manteca de cerdo y yema de huevo) no encontraron un aumento significativo en la masa corporal. Esto puede asociarse a las evidencias reportadas en ratas e igualmente en humanos en los que se ha encontrado que el tener una dieta alta en grasa no necesariamente conduce al sobrepeso u obesidad, es decir, algunos animales desarrollan el fenotipo de obesidad mientras otros son resistentes y mantienen un peso normal a pesar de la ingesta alta de calorías (Poveda *et al.*, 2008; Archer *et al.*, 2003).

Aunado a esto, las concentraciones de glucosa e insulina no cambiaron durante la administración de la dieta alta en grasa (Figura 9 y 10). Este resultado es similar a lo reportado por Poveda y colaboradores (2008) quienes demostraron que las ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa por un período corto de tiempo, no tenían cambios en la concentración de glucosa e insulina y no desarrollaron un estado de resistencia a la insulina debido a que la masa corporal no aumentó lo suficiente para modificar su producción. Nuestros resultados son congruentes con los resultados reportados para las ratas Wistar, pues los conejos no tuvieron una ganancia de peso significativa al tercer mes y, por tanto, pese a la administración de la dieta enriquecida con 20% de ácido palmítico no se vio afectada la producción de insulina y concentración de glucosa.

Así mismo, existen reportes de que las dietas altas en grasas pueden causar intolerancia a la glucosa y alteraciones en la función pancreática para la secreción de insulina, lo que ocasionaría que las concentraciones de insulina disminuyeran

(Otukonyong *et al.*, 2005); esta disminución se observó en las concentraciones de insulina del grupo AP a través del tiempo (Figura 10, panel B).

En contraste de lo que ocurrió en el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo de lípidos se vio modificado con la administración de la dieta enriquecida con ácido palmítico. Este cambio del perfil lipídico causado por la ingesta de dietas ricas en lípidos ya ha sido reportado, por ejemplo, Matsuzawa y colaboradores (2007) encontraron un cambio en la concentración sérica de triacilglicéridos (TG) y colesterol en ratas Wistar alimentadas con una dieta aterogénica. Chen y colaboradores (2013) demostraron que en conejos con administración de una dieta alta en grasa cambiaba el perfil lipídico con aumento significativo en HDL, LDL, colesterol total y triacilglicéridos. Nuestros resultados son semejantes al trabajo de Chen y colaboradores (2013), debido a que las concentraciones de colesterol (Figura 11) y de TG (Figura 12) fueron mayores en los grupos con administración de la dieta alta en grasa (AP y AP/AAS). Este aumento fue más evidente en TG, debido a que, durante los tres meses el grupo AP fue el que presentó la mayor concentración sérica promedio de TG, teniendo diferencias con el grupo CN en el tercer mes. Este aumento en la concentración de TG se conoce como hipertrigliceridemia, trastorno en el que incrementa su concentración y su causa es de diversas etiologías, pero principalmente se relaciona con la ingesta hipercalórica, además es asociada con la modificación de otros lípidos presentes en sangre (Bays *et al.*, 2013).

Con el aumento de TG se puede alterar el perfil de otros lípidos, como en la concentración de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Con el incremento de TG, hay un enriquecimiento de éste en LDL que es hidrolizado por la lipasa hepática, lo que conduce a la formación de partículas de LDL densas y pequeñas, entonces, de esta forma éstas son principalmente formadas debido al incremento de las concentraciones de TG y no depende de la masa total de grasa corporal (Klop *et al.*, 2013), esto es congruente con los datos de la concentración de LDL en el grupo AP y AP/AAS (30.75 mg/dL y 27.8 mg/dL) que correspondieron a la mayor concentración al tercer mes.

Por último, otra característica de la hipertrigliceridemia es que puede causar la disminución de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Miguel, 2009; Ros & Laguna, 2006; Bays *et al.*, 2013; Klop *et al.*, 2013). Nuevamente nuestros resultados coinciden con el reporte de la disminución de HDL, aunque no se demostraron diferencias significativas en la concentración al tercer mes de HDL, el grupo AP presentó la menor concentración (31.25 mg/dL) (Figura 14). Lo que nos hace proponer que esta disminución de HDL y aumento de LDL comenzaba a manifestarse como resultado de la dieta enriquecida con ácido palmítico, pero que, debido al tiempo en la que fue administrada (3 meses) esta alteración no se presentó de forma bien definida. Sin embargo, todos estos cambios en el perfil lipídico antes descritos, y la hipertrigliceridemia se conocen como dislipidemia. La dislipidemia pueden clasificarse de diferentes maneras: según el perfil lipídico, según su etiología o por la clasificación de Fredrickson (Brites *et al.*, 2010; Miguel 2009). Aunque de forma general se puede definir de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-037-SSA2-2012 Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias) como cualquier alteración de lípidos en sangre ya sea por colesterol (hipercolesterolemia), por los TG (hipertrigliceridemia), o bien por ambas (dislipidemia mixta).

Las dislipidemias pueden obedecer a causas genéticas o primarias, o a causas secundarias, estas últimas son de mayor frecuencia en los casos clínicos y suelen estar relacionadas con hábitos nocivos para la salud como el sedentarismo y la ingesta elevada de grasas saturadas y colesterol, o pueden asociarse con enfermedades (p. ej. DMT-2), con el consumo de alcohol o algunos fármacos p.ej. antirretrovirales y estrógenos (Miguel, 2009; Bays *et al.*, 2013). Como se mencionó, otra clasificación es la de Fredrickson, que divide a las hiperlipidemias en seis grupos (I, IIa, IIb, III, IV y V) según los patrones de aumento de lípidos y de lipoproteínas, esto para conocer el fenotipo de la dislipidemia. Sin embargo, en el presente trabajo no es posible definir el fenotipo de la dislipidemia observada, ya que no se obtuvieron valores de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) o quilomicrones.

En cuanto al grupo AP/AAS (ácido palmítico + ácido acetilsalicílico), éste presentó la concentración de HDL más elevada (42.4 mg/dL), siendo ligeramente mayor a la del grupo con dieta normal (CN: 40.8 mg/dL) y el grupo AAS (32.2 mg/dL). Este aumento de HDL causado por la administración de ácido acetilsalicílico es también reportado por Seth y colaboradores (2011) con ratas Wistar alimentadas con una dieta aterogénica quienes demostraron que la aspirina aumentaba las concentraciones de HDL y disminuía las concentraciones séricas de colesterol total, TG y LDL. Por lo que respecta al colesterol y TG en este mismo grupo (AP/AAS) se observó que las concentraciones fueron muy semejantes al grupo AP. Esto es similar a lo reportado por Cyrus y colaboradores (2002) quienes encontraron diferencias en cuanto a la concentración de colesterol total y TG en ratones deficientes del receptor de lipoproteína, alimentados con una dieta alta en grasa y con administración de una dosis baja de AAS y propusieron que el AAS no interfiere directamente en el metabolismo de estos lípidos y no afecta por tanto su concentración, lo cual es congruente con nuestros resultados de colesterol y TG en el grupo AP/AAS.

En cuanto a la función hepática, no se encontraron cambios significativos en la concentración de TGO, sin embargo, la máxima concentración de ésta se presentó en el grupo AP (56.25 U/L; Figura 15), mientras que para TGP hubo una diferencia significativa en su concentración entre el grupo AP/AAS y AAS ($P = 0.0181$; Figura 16). Si bien ambas enzimas están presentes en gran cantidad en el hepatocito, estas solo son liberadas al plasma cuando la membrana celular es dañada, aumentando así su concentración sérica. Sin embargo, pequeños incrementos en la concentración de TGO usualmente se deben a una causa no hepática que la elevan, debido a que puede ser producida por otros órganos y tejidos, modificando así su concentración plasmática. En cambio, la síntesis de TGP es más específica en el hígado, por tanto, su elevación puede asociarse a cambios hepatobiliares sin representar un daño grave (Hyeon *et al.*, 2004). Esto puede explicar las concentraciones de TGO y TGP que fluctuaron a través del tiempo y entre los grupos.

En cuanto a GGT y FA no se vio ningún cambio significativo en su concentración. Ambas mediciones combinadas son utilizadas principalmente para el diagnóstico de disfunción biliar. Por último, la concentración de LDH, no presentó cambios significativos. Esta enzima, aunque está presente en hepatocito, también es sintetizada por otros tejidos, lo cual le resta especificidad como indicadora de daño hepático, y solo puede ser útil en combinación de otras mediciones hepáticas (Daza *et al.*, 2008). Por tanto, estos resultados nos indican que, pese a la administración de la dieta alta en grasas durante tres meses, esta no causó un daño hepático ni disfunción biliar que generará el aumento sérico de dichas enzimas, y que es probable que estas pruebas sean más útiles solo en diagnóstico específico de lesión hepática y no como marcadores tempranos de cambios en la función hepática asociada a la ingesta de dietas altas en grasa.

7.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

De acuerdo con la cuantificación de ERO en tejido total de hígado mediante cuantificación de fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con respecto al control. Sin embargo, se presentó una producción de ERO semejante en los grupos AP y AAS (1042 UFR/mg de proteína), que además correspondieron al valor máximo de producción de ERO (Figura 20). En el caso del grupo AP esta diferencia en la producción de ERO con respecto al grupo control (703 UFR/mg de proteína) puede ser resultado de la administración de la dieta alta en grasas. Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en lípidos, pues estos son absorbidos en el intestino delgado, y son ensamblados en partículas ricas en lipoproteínas (quilomicrones) y son secretados en la sangre, la mayoría de estos quilomicrones son llevados hasta el tejido adiposo, pero el resto son llevados hacia el hígado (Klop *et al.*, 2013).

Una vez en el hígado, los ácidos grasos son esterificados con glicerol-3-fosfato para generar un triacilglicerol, y de esta forma pueden ser almacenados o secretados nuevamente a la circulación mediante una lipoproteína de baja densidad (VLDL) o bien pueden ser usados por el hepatocito para la β -oxidación llevada a cabo en mitocondria (Nassir & Ibdah, 2014). La ingesta constante de ácidos grasos causa

una desregulación en el consumo, liberación y almacenamiento de estos ácidos grasos en el hepatocito, provocando que sean hidrolizados de nuevo a acil-coenzima A (acil-CoA), y estos sean transportados al interior de la membrana interna mitocondrial, donde ingresan a la β -oxidación y se produce acetil-CoA, que ingresa al ciclo de Krebs, en esta ruta metabólica se producen sustratos respiratorios (NADH y FADH), donadores de protones de hidrogeno (H^+) y electrones para la cadena transportadora de electrones (CTE). Esta constante producción excede los requerimientos oxidativos de la célula, provocando una mayor formación de ERO por medio de la estimulación de la actividad de la CTE y la desregulación en la oxidación de ácidos grasos (Unger & Orci, 2000; Nassir & Ibdah, 2014).

Por otra parte, como se mencionó en el grupo AAS también se presentó una producción elevada de ERO, pero que a diferencia del grupo AP que recibió una dieta adicionada con grasa, esta producción puede ser debida a que posterior a la ingesta del AAS, este se hidroliza en tracto gastrointestinal, hígado y sangre, y finalmente se envía al hígado y se elimina por vía renal. En el hígado, el AAS puede producir varios salicilatos como producto de su metabolismo, algunos de éstos demostraron tener un efecto dañino en mitocondrias aisladas, ya que pueden desacoplar la fosforilación oxidativa. Por ejemplo, el AAS se transforma en acetil salicilato el cual se hidroliza por esterasas produciendo salicilato. Este compuesto se ha reportado como generador de ERO, ya que interactúa con la CTE generando peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que a su vez puede generar otros ERO (Battaglia *et al.*, 2005).

El grupo hidroxilo del salicilato también puede interactuar con el grupo Fe-S del complejo mitocondrial I provocando la formación de ERO. Además, tanto el AAS como el salicilato pueden afectar la homeostasis del calcio que está relacionado con cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que resulta en la ganancia o pérdida de electrones. Algunos reportes mencionan que el salicilato puede inducir una condición denominada “transición de permeabilidad mitocondrial”, que genera la entrada de diferentes iones como calcio, esto es importante ya que entre las funciones que se han caracterizado que lleva acabo la mitocondria, se ha

demostrado que es un importante organelo que regula activamente el perfil espacio-temporal del calcio intracelular bajo condiciones fisiológicas normales y anormales. La principal función del calcio en la mitocondria es la estimulación de la fosforilación oxidativa, por medio de la activación alostérica de la piruvato deshidrogenasa (PDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), α -ketoglutarato deshidrogenasa, α -glicerofosfato deshidrogenasa y adenina nucleótido translocasa (ANT), así como la estimulación de la síntesis de ATP (complejo V). Con el ingreso e incremento de la concentración de calcio en la mitocondria, puede estimular el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, resultando en la aceleración de la actividad de CTE y un mayor consumo de oxígeno, provocando una mayor pérdida de electrones y formación de ERO (Battaglia *et al.*, 2005; Brookes *et al.*, 2004).

Además de esto es importante mencionar que la semejanza en la producción de ERO en AP y AAS, puede deberse a la dosis administrada de ácido acetilsalicílico, sin embargo, faltarían ensayos en los que se prueben diferentes concentraciones de AAS y su efecto sobre la respiración mitocondrial y producción de ERO para fortalecer esta hipótesis.

En contraste con lo que encontramos en el grupo AP y AAS, la producción de ERO en el grupo AP/AAS (grasas + ácido acetilsalicílico) resultó ser menor con respecto al grupo AP. Esto puede deberse a que el AAS tenga un efecto antioxidante que reduzca los niveles de ERO, existen trabajos que han reportado que ciertos salicilatos tienen propiedades antioxidantes (AOX). Tal es el caso del ácido salicílico (Mahmood *et al.*, 2009) que puede disminuir el nivel de ERO y la respuesta pro-inflamatoria con un aumento concomitante en la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPX). Por último, debe considerarse que el hígado al ser un órgano rico en mitocondrias presenta una constante producción de ERO. Sin embargo, un sofisticado sistema antioxidante se ha desarrollado en mamíferos para el mantenimiento del homeostasis redóx en el hígado, que incluyen enzimas y moléculas con propiedades AOX (Li *et al.*, 2015). Este sistema AOX puede estar influyendo en la disminución de ERO en el hígado de conejo de nuestro modelo y sería importante realizar ensayos para registrar la actividad de estos sistemas AOX en estas condiciones para reforzar esta propuesta.

7.3 Expresión de *TLR-4*, *COX-2* e *IL-1 β*

Como se ha reportado en tejido adiposo el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico de bajo grado, nosotros esperábamos en nuestro modelo de estudio evidenciar este mismo proceso inflamatorio en hígado (órgano importante en el metabolismo de lípidos), mediante el suministro de una dieta alta en grasa, pero acorde a los resultados de $\Delta\Delta C_t$ obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 22), solo se encontró un cambio en la expresión del gen *TLR-4* en el grupo AP y se observó la mayor expresión de éste (6 veces más con respecto al control), seguido de AAS (4 veces más) y un ligero incremento en FAT/AAS (1.7 veces más). En contraste, los genes de *COX-2* y *IL-1 β* no presentaron cambio en su expresión.

Como se planteó en la hipótesis, se esperaba un aumento del ARN mensajero de estos dos últimos genes, puesto que las proteínas que codifican están involucradas y vinculadas con la respuesta pro-inflamatoria. El incremento de *IL-1 β* , estimula en ciertos tejidos o condiciones la expresión de genes asociados con la inflamación, como de *COX-2*, que a su vez puede intensificar dicha respuesta, mediante la síntesis de prostaglandinas (Dinarello, 2002; Vélez-Castrilón *et al.*, 2004). Aunque, como se mencionó en párrafos anteriores, esto no se presentó en nuestro modelo, debido probablemente a que el tiempo de administración de la dieta alta en grasa no fue suficiente para desencadenar un proceso inflamatorio o bien, debido a que en conejos jóvenes primero hay una condición de dislipidemia y un aumento en la producción de ERO, pero no hay todavía un proceso inflamatorio definido.

Sin embargo, el aumento en el grupo AP de la expresión del gen *TLR-4*, puede ser debida a la cantidad de ácidos grasos libres presentes en sangre y que son captados por el hepatocito. De acuerdo con los datos de las químicas sanguíneas de metabolismo de lípidos, el grupo AP presentó las mayores concentraciones séricas de lípidos. Esto puede causar el incremento en la expresión de *TLR-4*, puesto que su principal ligando son los LPS, así como ácidos grasos, entre ellos el ácido palmítico. En diferentes trabajos se ha demostrado que los ácidos grasos saturados de los LPS son importantes para el reconocimiento y activación del

receptor de TLR-4. Por tanto, los ácidos grasos, en particular los saturados, pueden activar TLR-4 que a su vez puede inducir la activación de la vía NF- κ B y la expresión de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias en el hepatocito (Gou & Friedman, 2010). Este aumento de la expresión de *TLR-4* por adición de ácidos grasos también ha sido reportado en otros modelos *in vitro* de cultivos de monocitos y macrófagos (Huang *et al.*, 2012). Y en el caso particular del ácido palmítico se ha demostrado en otros modelos que influye directamente en la activación de TLR-4, ejemplo de esto es el trabajo realizado por Yang y colaboradores (2015), quienes encontraron que, en cultivos de células del trofoblasto aisladas de placenta humana tratadas con ácido palmítico y ácido esteárico, ambos ácidos grasos aumentaban la expresión de TLR-4. También Nicholas y colaboradores (2017) demostraron en monocitos derivados de células dendríticas que el ácido palmítico funciona como un ligando de TLR-4 mediante la unión de éste al complejo TLR-4/MD2, necesario para su activación. Por último, Chen y colaboradores (2013) mostraron un aumento de la expresión de TLR-4 y otras moléculas promotoras de inflamación en macrófagos sanguíneos de conejos alimentados con una dieta alta en grasa. Sin embargo, aun tomando en cuenta estas evidencias, no debemos olvidar que el hígado en condiciones normales está constantemente expuesto a los ligandos de TLR provenientes de la microbiota intestinal, lo que conduce a una tolerancia mayor con respecto a otros órganos y por tanto presenta bajos niveles de ARNm de TLR (Huang *et al.*, 2012). Esto hace que este hallazgo resulte importante debido a que, con la ingesta de una dieta adicionada con 20% de ácido palmítico, hay un incremento en la expresión *TLR-4* el cual puede estar involucrado en el inicio de una respuesta inflamatoria en el hepatocito.

En cuanto al incremento de la expresión de *TLR-4* en el grupo AAS, puede ser atribuido a dos posibles causas: 1) una contraindicación del ácido acetilsalicílico es el desarrollo de problemas gastrointestinales, ya que al inhibir a la COX 1 y 2 se reduce la síntesis de prostaciclina y con ello, disminuye la protección de la mucosa gástrica que es una barrera contra patógenos y sustancias, haciéndola más susceptible al daño, y permitiendo un paso mayor de diferentes compuestos de origen microbiano intestinal (Díaz-Casasola, 2015), que pueden potencialmente

llegar al hígado e incrementar la expresión de *TLR-4* en el hepatocito; sugiriendo así, que el uso de ácido acetilsalicílico en condiciones fisiológicas normales puede tener un efecto deletéreo; o bien, 2) puede ser resultado de la producción de ERO, mediante la oxidación de lípidos, que se ha visto influye en la activación de TLR (Gill *et al.*, 2010), que es congruente con los resultados de producción de ERO total obtenidos en el grupo AAS.

Por último, la expresión de *TLR-4* fue mucho menor en el grupo FAT/AAS (1.7 veces más con respecto al control), lo cual nos hace proponer que, pese a la ingesta de ácidos grasos, el uso de ácido acetilsalicílico puede influir en el control de expresión de *TLR-4*, además de su posible efecto AOX, protegiendo de esta forma al hígado.

8. CONCLUSIONES

- La masa corporal de los conejos jóvenes, con 3 meses de administración de la dieta alta en grasa, no cambia, por tanto, no se evidenció un estado de sobrepeso u obesidad.
- La producción de insulina, así como la concentración de glucosa no parecen ser afectadas con la administración de una dieta enriquecida de ácido palmítico.
- El perfil lipídico se modificó con la administración de una dieta enriquecida de ácido palmítico, causando un aumento sérico de colesterol total y LDL y una ligera disminución de HDL, además de presentarse hipertrigliceridemia, un tipo de dislipidemia.
- Las concentraciones séricas de las enzimas TGO, TGP, GGT, FA y LDH no cambiaron significativamente durante la administración de la dieta, por tanto, se descarta la presencia de daño hepático o biliar, además de no funcionar como indicadores tempranos de la alteración de la función hepática causada por el consumo de una dieta rica en grasa.
- La administración de una dieta alta grasa o ácido acetilsalicílico aumenta la producción de ERO debido muy probablemente a la desregulación de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, al administrarse juntas, el ácido acetilsalicílico parece poseer un efecto antioxidante que ayuda a disminuir la producción de ERO.
- En hígado se descarta una respuesta inflamatoria generada por la administración de la dieta enriquecida con ácido palmítico, debido a que no cambio la expresión de los genes que codifican para las moléculas promotoras de inflamación: IL-1 β y COX-2. Sin embargo, el aumento de la expresión de *TLR-4*, puede indicar el comienzo de una alteración hepática generada por la dislipidemia, y que puede conducir al desarrollo de una respuesta inflamatoria con producción de ERO.

9. REFERENCIAS

1. Alvarenga, J. C. L. (2004). Genética en la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 12(4 Supl 3), S96-S101.
2. Archer, Z. A., Rayner, D. V., Rozman, J., Klingenspor, M., & Mercer, J. G. (2003). Normal Distribution of Body Weight Gain in Male Sprague-Dawley Rats Fed a High-Energy Diet. *Obesity Research*, 11(11), 1376-1383.
3. Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., & Heras, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(8), 2H-10H.
4. Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Flores, M., Durazo-Arvizu, R., Kanter, R., & Rivera, J. A. (2009). Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México*, 51, S595-S603.
5. Barsh, G. S., Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2000). Genetics of body-weight regulation. *Nature*, 404(6778), 644-651.
6. Battaglia, V., Salvi, M., & Toninello, A. (2005). Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33864-33872.
7. Bays, H. E., Toth, P. P., Kris-Etherton, P. M., Abate, N., Aronne, L. J., Brown, W. V., Gonzales-Campoy, M. J., Jones, R. S., Kumar, R., La Forge, R. & Samuel, V. T. (2013). Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of Clinical Lipidology*, 7(4), 304-383.
8. Brites, F. D., Rosso, L. A. G., Meroño, T., Boero, L. E., & Rivera, S. Clasificación y diagnóstico bioquímico de las dislipemias. (2010). [Consultado: 06/06/2017] Disponible en: http://www.fepreva.org/curso/4to_curso/bibliografia/volumen3/vol3_7.pdf
9. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), C817-C833.
10. Carrero & Herráez (S/A). "El mundo de los lípidos". [Consultado: 10/09/2016] disponible en: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/acgr-b-oxidacion.htm>

11. Córdova, V. J. A., Barriguete, M. J. A., Rivera, M. M. E., Manuell, L. G., Mancha, M. C. (2010). Sobrepeso y obesidad. Situación actual y perspectivas. *Acta Medica Grupo Ángeles*. Vol. 8. P. 203-206.
12. Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of Rheumatology*. Supplement, 49, 15-19.
13. Cyrus, T., Sung, S., Zhao, L., Funk, C. D., Tang, S., & Praticò, D. (2002). Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 106(10), 1282-1287.
14. Chawla, A., Nguyen, K. D., & Goh, Y. S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 738-749.
15. Chen, S., Lin, G., Lei, L., You, X., Wu, C., Xu, W., Huang, M., Luo, L., Wang, Z., Li, Y., Zhao, X. & Yan, F. (2013). Hyperlipidemia modifies innate immune responses to lipopolysaccharide via the TLR-NF-κB signaling pathway. *Inflammation*, 36(4), 968-976.
16. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7:30.
17. Chudek, J., & Wiêcek, A. (2006). Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. *Pharmacol Reports*, 58(Suppl), 81-88.
18. Daza, E. F., Juan, E. F., Mejía, I. M., & Mejía, M. M. (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio*, 14(11-12), 533-546.
19. De Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*, 138(3), 295-8.
20. Díaz-Casasola, L. (2015). Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. *Enfoques fisiológico y bioquímico*. *Revista de Medicina e Investigación*, 3:100-3.
21. Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20(5; SUPP/27), S1-S13.
22. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2016). Instituto Nacional de Salud Pública y Secretaría de Salud. [Consultado: 30/05/2017] Disponible en: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf

23. Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105(2), 141-150.
24. Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679-689.
25. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761.
26. García-García, E., Llata-Romero, D., Kaufer-Horwitz, M., Tusié-Luna, M. T., Calzada-León, R., Vázquez-Velázquez, V., Barquera-Cervera, S., Caballero-Romo, J., Orozco, L., Velásquez-Fernández, D., Rosas-Peralta, M., Barriguete-Meléndez, A., Zacarías-Castillo, R. & Sotelo-Morales, J. (2008). La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública: Una reflexión. *Salud Pública de México*, 50(6), 530-547.
27. García-Uriagüen, P. (2012). La alimentación de los mexicanos, cambios sociales y económicos y su impacto en los hábitos alimenticios. Cámara Nacional de la Industria de la Transformación. México, D.F. Pp. 340.
28. Gill, R., Tsung, A., & Billiar, T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9), 1121-1132.
29. Guo, J., & Friedman, S. L. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 3(1), 1.
30. Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. México. Instituto Nacional de Salud Pública. P. 200.
31. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, y Flaherty DM. (1999). Dihydro-fluorescein Diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2'7' Dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-Carboxy-2'7' Dichlorodihydrofluorescein diacetate and Dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(1-2): 146–159.
32. Hijona, E., Hijona, L., Arenas, J. I., & Bujanda, L. (2010). Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators of Inflammation*, 2010.

33. Holum, J. (2011). "Fundamentos de Química General, Orgánica y Bioquímica para Ciencias de la Salud". CAP. Veinte Lípidos. Edit. LIMUSA S.A DE C.V. México.
34. Huang, S., Rutkowsky, J. M., Snodgrass, R. G., Ono-Moore, K. D., Schneider, D. A., Newman, J. W., Adams, H. S. & Hwang, D. H. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of Lipid Research*, 53(9), 2002-2013.
35. Hyeon, C. K., Chung, M. N., Sun, H. J., Kwang, H. H., Oh, D. K., & Suh, I. (2004). Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ*, 328(7446), 983.
36. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, E. G., Moore, K. Roberts, J. & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1-6.
37. Klop, B., Elte, J. W. F., & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 5(4), 1218-1240.
38. Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods of their quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (6): 620-50.
39. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124.
40. Liu, C., Tao, Q., Sun, M., Wu, J. Z., Yang, W., Jian, P., Peng, J., Hu, Y., Lui, C., & Liu, P. (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Laboratory Investigation*, 90(12), 1805-1816.
41. Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
42. Lyons, C. L., Kennedy, E. B., & Roche, H. M. (2016). Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*, 8(5), 247.
43. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A. & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and

ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1(11), 1155-1161.

44. Mahmood, K. A. S., Ahmed, J. H., & Jawad, A. M. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), free radicals and reactive oxygen species (ros): A review of literature. *Med J Basrah Univ*, 27, 46-53.

45. Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., & Buono, P. (2015). Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: Effects on Health. *Molecules*, 20(9), 17339-17361.

46. Mariel A. A., & Outomuro, D. (2009). Hígado graso no alcohólico: una entidad cada vez más frecuente y de pronóstico incierto. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 29(1), 44-50.

47. Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., Yokoyama, M., Hinda, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., Miyamoto, K. I. & Kaneko, S. (2007). Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*, 46(5), 1392-1403.

48. Mba, O. I., Dumont, M. J., & Ngadi, M. (2015). Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry—a review. *Food Bioscience*, 10, 26-41.

49. Mencin, A., Kluwe, J., & Schwabe, R. F. (2009). Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*, 58(5), 704-720.

50. Miguel, S. P. E. (2009). Dislipidemias. *Acimed*, 20(6), 265-273.

51. Milagro, F. I., Campión, J., & Martínez, J. A. (2006). Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity*, 14(7), 1118-1123.

52. Nansseu, J. R. N., & Noubiap, J. J. N. (2015). Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease. *Thrombosis Journal*, 13(1), 1.

53. Nassir, F., & Ibdah, J. A. (2014). Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8713-8742.

54. Nicholas, D. A., Zhang, K., Hung, C., Glasgow, S., Aruni, A. W., Unternaehrer, J., Payne, J. K., Langridge R. H. W. & De Leon, M. (2017). Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *Plos One*, 12(5), e0176793.

55. NORMA Oficial Mexicana (NOM-037-SSA2-2012) Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. (2012). [Consultado: 06/06/2017]

Disponible en: <http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/nom/NOM-037-SSA2-2012.pdf>

56. OCDE. 2014. OBESITY. [Consultado: 06/09/2016]. Disponible en: <http://www.oecd.org/health/Obesity-Update-2014.pdf>
57. Otukonyong, E. E., Dube, M. G., Torto, R., Kalra, P. S., & Kalra, S. P. (2005). High-fat Diet-induced Ultradian Leptin and Insulin Hypersecretion are Absent in Obesity-resistant Rats. *Obesity Research*, 13(6), 991-999.
58. Poveda, E., Trujillo, P., Ruiz, F., & Lopez, E. (2008). Glicemia y concentraciones de insulina en sangre de ratas Wistar sometidas a dieta alta en grasa y tratamiento con péptidos miméticos de leptina. *Biomédica*, 28, 50-63.
59. Rajala, M. W., & Scherer, P. E. (2003). Minireview: the adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, 144(9), 3765-3773.
60. Rodriguez, G. M., & Rodriguez, L. W. (2006). "PCR en tiempo real, Métodos físicoquímicos en Biotecnología". IBT, UNAM. Pp.55.
61. Ros, E., & Laguna, J. C. (2006). Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(4), 52D-61D.
62. Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197.
63. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press. Vol. 2, pp. 14-9
64. Sánchez-Castillo, C. P., Pichardo-Ontiveros, E., & López, R. P. (2004). Epidemiología de la obesidad. *Gac Med Mex*, 140(2), 3-20.
65. Schmitt, M. E., Brown, T. A., & Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18(10), 3091.
66. Schnupf, P., & Sansonetti, P. J. (2012). Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute *Shigella flexneri* infection. *PLoS One*, 7(6), e36446.
67. Sethi, A., Parmar, H. S., & Kumar, A. (2011). The Effect of Aspirin on Atherogenic Diet-Induced Diabetes Mellitus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108(6), 371-377.

68. Song, J, Ke S.F., Zhou, C. C., Zhang, S. L., Guan, Y. F., Xu, T. Y., Sheng, C. S., Wang, P. & Miao C.Y. (2013). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Is Required for the Calorie Restriction–Mediated Improvements in Oxidative Stress, Mitochondrial Biogenesis, and Metabolic Adaptation. *J Gerontol A BiolSciMed Sci*; 69(1):44–57.
69. Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of Proteins. *Methods Enzymology*. Vol. 182: 50-69.
70. Trauner, M., Arrese, M., & Wagner, M. (2010). Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 299-310.
71. Unger, R. H., & Orci, L. (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 24.
72. Vandvik, P. O., Lincoff, A. M., Gore, J. M., Gutterman, D. D., Sonnenberg, F. A., Alonso-Coello, P., Akl, A. E., Lansberg, G. M., Guyatt, H. G. & Spencer, F. A. (2012). Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. *American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *CHEST Journal*, 141(2suppl), e637S-e668S.
73. Vélez-Castrillón, S., Camargo, J., Correa, P., & Anaya, J. (2004). Bases moleculares de la familia de la interleuquina 1. *Revista Colombiana de Reumatología*, 11(1), 11-39.
74. Wisse, B. E. (2004). The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(11), 2792-2800.
75. World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic (No. 894). World Health Organization.
76. Yang, X., Haghiac, M., Glazebrook, P., Minium, J., Catalano, P. M., & Hauguel-de Mouzon, S. (2015). Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts. *Human Reproduction*, dev173.

10. APÉNDICE

10.1 Extracto celular, ERO y cuantificación de proteínas por curva estándar de BSA

Buffer de fosfatos (PBS):

Para preparar un stock 10x en 100 ml, pesar 8 grs de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 gr de cloruro de potasio (KCl), 1.44 gr de fosfato disódico (Na₂HPO₄) y 0.24 gr de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), disolver en 80 ml de agua destilada y ajustar pH a 7.4 y aforar a 100 ml. Esterilizar y almacenar a 4°C.

Stock de 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA):

Pesar lo necesario para preparar un stock de DCDHF-DA 500 µM en un volumen de 7 ml, el cual se disuelve primero en 3.5 ml de NaOH 0.01 N y se deja en oscuridad por 30 minutos, después se adiciona 3.5 ml de agua estéril. Obteniendo una concentración final de DCDHF-DA 500 µM, alicuotar en tubos eppendorf y forrarlos con papel aluminio y almacenarlos en frasco color ambar a 4°C.

Curva estándar de BSA:

Pesar 0.01 grs de albúmina de suero bovino (BSA) y diluir cuidadosamente en 10 ml de agua estéril para obtener una concentración de 1 mg/ml y almacenar a -20°C.

Para la cuantificación de proteínas preparar la siguiente curva:

# Tubo	Stock BSA [] mg/ml (µl)	H ₂ O destilada (µl)	Concentración final (mg/ml)
1	25	475	0.05
2	50	450	0.1
3	125	375	0.25
4	250	250	0.5
5	375	125	0.75
6	500	-----	1

Una vez preparada la curva y los tubos problemas, leer y registrar la absorbancia en espectrofotómetro en celda de cuarzo y luz UV a una longitud de onda de 280nm.

10.2 Extracción de DNA mediante fenol básico

Fenol básico:

Ultra Pure™ Buffer-Saturated Phenol. pH 7.5 – 7.8. Invitrogen. Cat. #: 15513-047.

Buffer de lisis:

Triton X-100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris Base 10 Mm (pH 8) y EDTA disódico 1mM. Mantener a temperatura ambiente.

Mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1)

Para 5 ml: Fenol básico 2.4 ml; Cloroformo 2.5 ml; alcohol isoamílico 100 µl. Almacenar a 4°C.

Agua con pirocarbonato de dietilo (DEPC) al 0.1%:

Para 1 L: A un litro de agua estéril agregar 1 ml de DEPC. Mantener en agitación mínimo 2 hrs o más, esterilizar y alicuotar si es necesario. Almacenar a 4°C.

10.3 Extracción de RNA mediante fenol ácido

Fenol ácido:

Phenol Solution. pH 4.3. SIGMA. Cat. #: 4682.

Buffer AE:

EDTA 10 mM (pH 7.4), Acetato de Sodio 50 mM (pH 7). Filtrar (con malla de 0.22 µm) y almacenar a 4°C.

Mezcla Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1)

Para 5 ml: Cloroformo 2.5 ml; alcohol isoamílico 100 µl. Almacenar a 4°C.

10.4 Gel desnaturalizante

Preparación de MOPS-Acetato de Sodio-EDTA (MAE 10x):

Preparar un stock de Acetato de Sodio 3 M y otro de EDTA 0.5 M, este último esterilizar y ajustar pH a 7.4.

Para 100 ml de MAE pesar 4.185 grs de MOPS (para una concentración de 0.2 M) y disolver en 50 ml de agua, agregar 1.66 ml de solución 3 M de acetato de sodio y 2 ml de EDTA (para una concentración final de 0.05 M y 0.01 M respectivamente), aforar hasta 100 ml, filtrar en malla de 0.22 μm y almacenar a 4°C.

Amortiguador de carga para la muestra: Mezclar en un tubo eppendorf 125 μl de formamida, 42 μl de formaldehído y 25 μl de MAE 10x. Y usar aproximadamente 16 μl por cada 5 o 10 μg de muestra de RNA, y dejar 5 minutos a 65°C y después dejar un minuto en hielo. Agregar 0.2 μl de bromuro de etidio y azul de carga a cada muestra, previo a cargar en gel.

Para el gel desnaturalizante: Para un gel de 50 ml, pesar 0.5 grs de agarosa y fundir en 40 ml de agua destilada, dejar enfriar un poco y agregar cuidadosamente 5 ml de MAE 10x y 5 ml de formaldehído, verter en la canasta de la cámara y dejar solidificar.

Para buffer de corrida 1x: Para 300 ml de buffer agregar 30 ml de MAE 10x, 9 ml de formaldehído y aforar con agua DEPC o estéril. Antes de usar refrigerarlo previamente para usarlo frío durante la corrida del gel.

10.5 Electroforesis en gel de agarosa

Azul de carga: mezclar 2.5 ml de glicerol estéril con 2.5 ml de agua estéril, y adicionar una pizca pequeña de azul de bromofenol y mezclar bien, filtrar (con malla de 0.22 μm) y alicoutar. Puede mantenerse a temperatura ambiente o 4°C.

Buffer Tris, Ácido bórico, EDTA (TBE):

Para TBE 10X en un litro de agua destilada, disolver: 108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico y 40 ml EDTA 0.5 M, pH 8. Mantener a temperatura ambiente.