



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

ALUMNA:

Q.F.B. LUCERO CANTO GUERRERO

PROYECTO:

**Efecto de las vitaminas A, D y E sobre la expresión del gen de la proteína
que une al retinol-4 (RPB-4) en adipocitos 3T3-L1**

DIRECTOR:

Dr. en C. Pablo García Solís

Noviembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

EFFECTO DE LAS VITAMINAS A, D Y E SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA
QUE UNE AL RETINOL-4 (RPB-4) EN ADIPOCITOS 3T3-L1

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Q. F.B LUCERO CANTO GUERRERO

DIRIGIDO POR

DR. EN C. PABLO GARCÍA SOLÍS

Dr. en C. Pablo García Solís
Presidente

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez
Secretario

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Vocal

Dra. en C. Ana Alicia Sánchez Tusie
Suplente

Dr. en C. Hebert Luis Hernández Montiel
Suplente

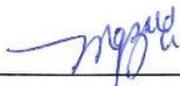












Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Director de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

RESUMEN

México presenta un problema de salud pública derivado del sobrepeso y la obesidad. Durante el estado de sobrepeso y obesidad, hay una acumulación excesiva de ácidos grasos en el tejido adiposo, ocasionando un estado de inflamación crónica de bajo grado. Se ha observado un aumento en la concentración sérica de la proteína RBP-4 durante el sobrepeso y obesidad que se correlaciona con el desarrollo de complicaciones como resistencia a la insulina, hipertensión arterial, dislipidemia y esteatosis hepática. Disminuir los niveles de RBP-4 podría ayudar a reducir la hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo. Las vitaminas son nutrientes esenciales que el cuerpo humano requiere en mínimas cantidades, por lo cual se les denomina micronutrientes; se ha observado experimentalmente que las vitaminas A, D y E afectan las concentraciones de adipocinas. Por lo tanto, en este proyecto se estudió el efecto de las vitaminas A, D y E en la acumulación de lípidos en adipocitos y en la expresión de la proteína RBP-4. Se utilizaron adipocitos de la línea 3T3-L1, los cuales fueron diferenciados a partir de fibroblastos. Por un lado, se evaluó la acumulación de lípidos mediante la tinción de rojo oleoso, por otro lado, se evaluó la expresión del gen RBP-4 mediante PCR en tiempo real. El grado de tinción fue menor en los adipocitos tratados con las vitaminas disminuyendo la frecuencia y la intensidad del color rojo en el sistema RGB. La administración de vitaminas A, E y D disminuye la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, mostrando un efecto dosis respuesta. La expresión de RBP-4 es regulada por efecto de la administración de vitaminas A, E y D en cultivos de adipocitos 3T3-L1.

ABSTRACT

Mexico presents a public health problem derived from overweight and obesity. During the state of overweight and obesity, there is an excessive accumulation of fatty acids in adipose tissue, causing a state of chronic inflammation of low grade. An increase in the serum concentration of the RBP-4 protein has been observed during overweight and obesity that correlates with the development of complications such as insulin resistance, arterial hypertension, dyslipidemia and hepatic steatosis. Decreasing the levels of RBP-4 could help reduce hyperplasia and hypertrophy in adipose tissue. Vitamins are essential nutrients that the human body requires in minimal quantities, which is why they are called micronutrients; It has been experimentally observed that vitamins A, D and E affect the concentrations of adipokines. Therefore, in this project we studied the effect of vitamins A, D and E in the accumulation of lipids in adipocytes and the expression of RBP-4. Adipocytes of the 3T3-L1 line were used, which were differentiated from fibroblasts, the accumulation of lipids with oily red staining was evaluated, the expression of the RBP-4 gene was evaluated by real-time PCR. The degree of staining was lower in the adipocytes treated with the vitamins diminishing the frequency and the intensity of the red color in the RGB system. The administration of vitamins A, E and D decreases the accumulation of lipids in differentiated 3T3-L1 adipocytes, showing a dose-response effect. The expression of RBP-4 is regulated by the administration of vitamins A, E and D in 3T3-L1 adipocyte cultures.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Sobrepeso y obesidad	2
2.1.1 Epidemiología.....	3
2.1.2 Obesidad en México.....	4
2.2 Homeostasis energética.....	5
2.3 Tejido adiposo.....	6
2.3.1 Componentes celulares del tejido adiposo	6
2.3.2 Distribución del tejido adiposo	7
2.3.3 Tejido adiposo blanco.....	7
2.3.4 Características del tejido adiposo blanco	8
2.4 La obesidad como un proceso inflamatorio.....	9
2.4.1 La obesidad y sus complicaciones	11
2.5 Obesidad y deficiencia de micronutrientos.....	12
2.6 Vitaminas	14
2.6.1 Vitamina A	15
2.6.1.1 Fuentes de vitamina A	15
2.6.1.2 Equivalencias de retinol y β -carotenos	16
2.6.1.4 Almacenamiento de los retinoides	17
2.6.1.5 Metabolismo de los retinoides.....	19
2.6.1.6 Transporte de los retinoides en la circulación	21
2.6.1.7 Estructura de los retinoides.....	23
2.6.1.8 Mecanismo de acción de los retinoides	26
2.6.1.8.1 Receptores citoplásmicos	26
2.6.1.8.3 Receptor PPAR γ	28

2.6.1.9 Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP-4).....	31
2.6.1.10 STRA6: Receptor de membrana estimulado por retinol que media la absorción celular de vitamina A de la sangre	33
2.6.2 Vitamina D	39
2.6.2.1 Fuentes de vitamina D.....	40
2.6.2.2 Vitamina D y sus metabolitos	41
2.6.2.3 Concentraciones séricas de vitamina D.....	43
2.6.2.4 Causas de la deficiencia de la vitamina D	44
2.6.2.5 Mecanismos de acción de la vitamina D.....	45
2.6.2.6 Regulación del metabolismo de la vitamina D	46
2.6.2.7 Almacenamiento, transporte y eliminación de la vitamina D.....	47
2.6.2.8 El tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina D.....	48
2.6.2.9 Producción de [1,25-(OH) ₂ -D ₃] por el tejido adiposo	50
2.6.2.10 Expresión de VDR en el tejido adiposo	51
2.6.2.11 Acción genómica de la [1,25-(OH) ₂ -D ₃]	51
2.6.2.12 La vitamina D juega un papel fundamental en la modulación de la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo.....	52
2.6.2.13 Vitamina D y obesidad.....	53
2.6.2.14 ¿La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo independiente para la obesidad?	54
2.6.3 Vitamina E	55
2.6.3.5 Vitamina E y obesidad	65
2.7 Adipogénesis	67
2.7.1 Receptores C/EBP.....	68
2.8 Línea celular 3T3-L1	71
2.8.1 Inductores adipogénicos	73
2.8.2 Rol de los inductores adipogénicos	75
III. JUSTIFICACIÓN	77
IV. HIPÓTESIS.....	78
V. OBJETIVOS.....	79
a. General	79
b. Particulares.....	79

VI. Metodología	80
6.1 Diferenciación de células 3T3-L1	80
6.2 Diseño experimental	81
6.2.1 Obtención de las muestras:.....	82
6.3 Tinción de las muestras con rojo oleoso O	83
6.4 Extracción de RNA total	83
6.5 PCR de punto final	84
6.6 Análisis estadístico.....	84
VII. RESULTADOS Y DICUSIONES.....	85
7.1 Diferenciación de adipocitos 3T3-L1	85
7.2 Tinción de adipocitos 3T3-L1 con rojo oleoso.....	85
7.3 Expresión de RBP-4.....	92
VIII. CONCLUSIONES	97
IX. REFERENCIAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México	4
2	Cambios metabólicos inducidos por una dieta hiperenergética	10
3	Esquema generalizado para el metabolismo de los retinoides	18
4	Diagrama del proceso de absorción y distribución de los retinoides	20
5	Metabolismo y transporte de la vitamina A en la circulación	21
6	Transporte y almacenamiento de retinol	22
7	El retinol y sus principales metabolitos	25
8	Regulación de la expresión de genes retinoides	28
9	Estructura general de los PPARs	29
10	Esquema de la unión de PPAR con RXR para la expresión de genes	30
11	Papel de los receptores PPAR γ y RXR	31
12	Estructura de la proteína RBP-4	32
13	Receptor transmembrana STRA6	34
14	Diagrama de que muestra el modelo transmembrana de STRA6	35
15	Mecanismo de RBP-4 en la activación de SOCS3 y PPAR γ	36
16	Esquema de la absorción de vitamina A mediada por STRA6	38
17	Estructura de la vitamina D ₃ y D ₂ y sus precursores	39
18	Metabolismo de la vitamina D	42
19	Estructura básica de los tocoferoles y tocotrienoles	55
20	Estereoisómeros del α -tocoferol	57
21	Mecanismo de la peroxidación lipídica	59
22	Reacción antioxidante del alfa tocoferol	60
23	La vitamina E como mediador de señalización celular	65
24	Diagrama de adipogénesis	68

25	Etapas de la diferenciación de los adipocitos	70
26	Etapas de la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1	73
27	Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en cultivo	81
28	Diseño experimental	82
29	Vacuolas de grasa de adipocitos 3T3-L1 diferenciados	85
30	Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina A y teñidos con rojo oleoso O.	86
31	Histogramas de intensidad con el parámetro R en pixeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina A y teñidos con rojo oleoso O	87
32	Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso O	88
33	Histogramas de intensidad con parámetro R en pixeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso O.	89
34	Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina E y teñidos con rojo oleoso O.	90
35	Histogramas de intensidad con parámetro R en pixeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso.	91
36	Gel de electroforesis de productos de PCR punto final	93
37	Expresión de genes en PCR en tiempo real.	94
38	Cambio en expresión de gen RBP-4	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de la obesidad por IMC de acuerdo con la OMS	3
2	Primers utilizados para la expresión de RBP-4 y Actina	93

I. INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad están relacionados con el aumento de grasa corporal causando un desequilibrio bioquímico del metabolismo en el organismo. Durante el estado de sobrepeso y obesidad, hay una acumulación excesiva de ácidos grasos en el tejido adiposo, ocasionando un estado de inflamación crónica de bajo grado. Este estado de inflamación ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, dislipidemia, entre otras.

Las vitaminas son nutrientes esenciales que el cuerpo humano requiere en mínimas cantidades, por lo cual se les denomina micronutrientes. Las causas de la obesidad son multifactoriales, sin embargo, la ingesta excesiva de macronutrientes es uno de los factores que se asocian a la obesidad con más frecuencia, aunado a un bajo consumo de micronutrientes. Dentro de las deficiencias que son detectadas con mayor frecuencia en las poblaciones en todo el mundo son las vitaminas, es especial las vitaminas A, D y E.

La proteína RBP-4 tiene como función transportar a la vitamina A; la concentración circulante de esta proteína se ha correlacionado positivamente con las medidas de adiposidad y con parámetros inflamatorios en individuos con sobrepeso y obesidad. RBP-4 es sintetizada principalmente en el hígado y en el adipocito. Se ha observado experimentalmente que las vitaminas A, D y E afectan las concentraciones de muchas adipocinas sintetizadas por el tejido adiposo.

Por lo anterior, la prevención y el control del sobrepeso y la obesidad son primordiales para disminuir los problemas de salud que enfrenta en la actualidad la población mexicana. Por lo tanto, en este proyecto se estudió el efecto de las vitaminas A, D y E en la expresión de RBP-4 y acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1.

II. ANTECEDENTES

2.1 Sobrepeso y obesidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad, se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo y en otros órganos metabólicos, que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2017). La obesidad es una enfermedad compleja multifactorial, reconociéndose factores genéticos, epigenéticos, socioeconómicos, culturales y ambientales (Prieto y col., 2011). El exceso de peso corporal es un proceso gradual que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, a partir de un desequilibrio crónico entre la cantidad de energía ingerida y el gasto energético (Barrera y col., 2013). Se ha visto una tendencia universal a tener una mayor ingesta de alimentos hiperenergéticos, los cuales son ricos en lípidos e hidratos de carbono, pero pobres en vitaminas y nutrimentos inorgánicos (Moreno, 2012; OMS, 2017). Otro aspecto de relevancia es el descenso de la actividad física, como resultado del estilo de vida, que cada vez es más sedentario, debido a las nuevas formas de trabajo, modos de transporte y la creciente urbanización (Dávila y col., 2015; Strauss y col., 2018). Es importante mencionar que la obesidad es una enfermedad que no es exclusiva de países económicamente desarrollados, que involucra a todos los grupos de edad, de distintas etnias y de todas las clases sociales (Barrera y col., 2013).

La OMS clasifica el grado de sobrepeso y obesidad utilizando el índice de masa corporal (IMC) que es una relación entre el peso y la talla. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos entre su talla en metros elevada al cuadrado (OMS, 2017). Una persona se considera obesa cuando su IMC es $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, mientras que un IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ es considerado con sobrepeso (Cuadro 1), misma definición que utiliza la Norma Oficial Mexicana (NOM-008-SSA3-2010) para la clasificación integral del sobrepeso y la obesidad (OMS, 2017). El IMC se utiliza frecuentemente para identificar el estado nutricional de la población, puesto que es el mismo índice para ambos sexos y para los adultos de todas las edades (Dávila y col., 2015).

Clasificación	IMC (Kg/ m ²)
Bajo peso	< 18.5
Normopeso	18.5 - 24.9
Sobrepeso	≥ 25
Obesidad	≥ 30
Obesidad tipo I	30 - 34.9
Obesidad tipo II	35 - 39.9
Obesidad tipo III	40 – 49.9
Obesidad tipo VI	> 50

Cuadro 1. Clasificación de la obesidad por IMC de acuerdo con la OMS (Adaptada de Dávila y col., 2015; OMS, 2017). El IMC es una fórmula que representa la relación entre masa corporal en kilogramos y la estatura en metros cuadrados. Esta prueba se fundamenta en el supuesto de que las proporciones de masa corporal/peso en ambos sexos, poseen una correlación positiva con el porcentaje de grasa corporal que posee el cuerpo. Las personas con un IMC entre 25 y 29.9 Kg/m^2 , presentan mayor riesgo de desarrollar obesidad. Por lo que aquellas personas con un IMC alto dentro de la clasificación, comúnmente se asocia con mayor riesgo de mortalidad debido al desarrollo de patologías como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

2.1.1 Epidemiología

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad en varios países se ha descrito como una pandemia global (Popkin y col., 2012; OMS, 2017). En el 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. Esto quiere decir que, el 39% de la población adulta mundial (un 39% en los hombres y un 40% en las mujeres) presentaron sobrepeso, y el 13% (un 11% para hombres y un 15% para mujeres) presentaron obesidad. En cuanto a la población infantil, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos y más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) tenían sobrepeso u obesidad (Ng y col., 2014; OMS, 2017).

2.1.2 Obesidad en México

El sobrepeso y la obesidad se han convertido en la última década en un problema de salud pública en México. En la actualidad, México ocupa los primeros lugares de prevalencia mundial de obesidad en la población adulta con más del 30% (Gunanti y col., 2014). En el 2012 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) evaluó la prevalencia de sobrepeso y obesidad (prevalencia combinada) en niños, adolescentes y adultos. Los resultados reportaron que la población adulta, individuos mayores de 20 años presentaron una prevalencia combinada del 71.2%. Respecto a la población infantil, el 34.4% de los niños de 5 a 11 años mostraron sobrepeso y obesidad. En cuanto a los adolescentes de 13 a 19 años fue de 34.9%, siendo igual de predominante tanto en hombres como en mujeres (ENSANUT, 2012). De acuerdo con ENSANUT de medio camino 2016, estas cifras han aumentado en los tres grupos de edad en ambos sexos; en niños en edad escolar la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 34.4%, en adolescentes de 36.3% y en adultos de 72.5%. Y se estima que esta prevalencia se duplicará para el año 2030 (ENSANUT de medio camino, 2016).

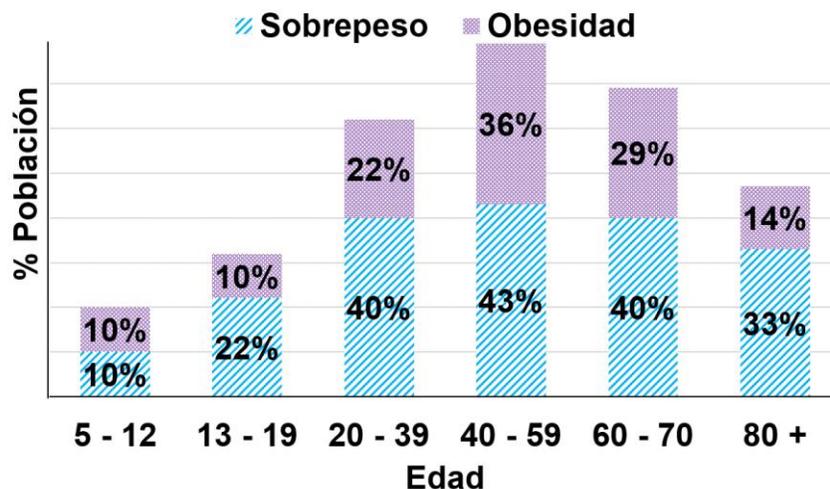


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México (Adaptada de ENSANUT 2012). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición es un proyecto del Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud Federal que permite conocer cuál es el estado de salud y las condiciones nutricionales de los diversos grupos de edades que conforman la población

mexicana. ENSANUT 2012 reportó que más del 70% de la población adulta (mujeres, 71.9%; hombres, 66.7%), entre los 30 y los 60 años, tenía exceso de peso. Estos datos indicaron que la prevalencia de sobrepeso es más alta en hombres (42.5%) que en mujeres (37.4%), mientras que la prevalencia de obesidad es mayor en las mujeres (34.5%) que en los hombres (24.2%).

2.2 Homeostasis energética

La homeostasis se define como el estado de equilibrio dinámico o el conjunto de procesos fisiológicos implicados en los mecanismos de digestión, absorción de nutrientes, almacenamiento de los mismos, así como su utilización y consiguiente gasto cuando el organismo lo requiere (Kirsz y Zieba, 2012). De esta forma todos los seres vivos tienden a alcanzar una estabilidad en las propiedades de su medio interno y por lo tanto de la composición bioquímica de los líquidos y tejidos celulares, para mantener la vida (Sam y Mazzone, 2014). El equilibrio entre la energía ingerida a través de los alimentos y la energía gastada por el metabolismo celular da como resultado el buen funcionamiento del organismo y esto es posible gracias a la coordinación entre diferentes sistemas que van desde estructuras nerviosas centrales hasta el tejido adiposo (González y col., 2010).

Bajo este contexto, el tejido adiposo es crucial para la homeostasis energética, ya que el tejido adiposo, es la principal fuente de ácidos grasos para obtener los requerimientos de energía y producción de calor durante periodos postprandiales (Rutkowski y col., 2015). Sin embargo, el exceso de acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo se acompaña por un estado de inflamación crónica de bajo grado (Gregor y Hotamisligil, 2011). Este estado de inflamación ha sido asociado con el desarrollo de alteraciones metabólicas y fisiológicas en órganos como el hígado, riñón, músculo esquelético y tejido adiposo, generando hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión e hígado graso (Saltiel y Olefsky, 2017). Estas alteraciones conforman al síndrome metabólico y se asocian con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, dislipidemia, entre otras (Prieto y col., 2011; Saltiel y Olefsky, 2017).

2.3 Tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido conectivo constituido predominantemente de adipocitos (células especializadas en almacenar grasa), el cual está estrechamente relacionado con el control del metabolismo de lípidos y de glucosa (Rutkowski y col., 2015). Sin embargo, en 1994 se descubrió a la leptina; la primera hormona identificada como producto de secreción del tejido adiposo, pero con acción en el sistema nervioso central (Zhang y col., 1994). Fue así como se empezó a considerar al tejido adiposo como un órgano endócrino, el cual sintetiza una gran variedad de hormonas y proteínas con actividad biológica, generalmente conocidas como adipocinas (Gutiérrez y col., 2012). Hoy en día, se sabe que el tejido adiposo no sólo es un órgano almacenador de energía, sino que también a través de señales endócrinas, parácrinas y autócrinas, le permiten regular el metabolismo tanto en adipocitos como en otros órganos y sistemas, tales como; el hígado, músculo esquelético, páncreas y sistema nervioso central (Wozniak, 2009), que, además, estos órganos y sistemas son estructuras que presentan funciones específicas en procesos como inmunidad, inflamación y reproducción (Guilherme y col., 2008).

2.3.1 Componentes celulares del tejido adiposo

El tejido adiposo es muy heterogéneo a nivel de composición celular; está constituido por adipocitos maduros, inmersos en una matriz de colágeno donde también residen células madre mesenquimales, fibroblastos, preadipocitos, terminales nerviosas, células inmunes y tejido vascular, que en conjunto se denomina fracción de estroma vascular (SVF, por sus siglas en inglés) (Francisco y col., 2018).

Los adipocitos son las células más abundantes dentro del tejido adiposo constituyendo el 25% del número total de células, son esféricos, de tamaño muy variable, que oscila entre los 20 y 200 μm de diámetro (Vega., 2010). Estas células acumulan energía en forma de triglicéridos (TAG), diacilglicerol, fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol, los cuales son

almacenados en el interior de orgánulos altamente especializados llamados gotas lipídicas (Francisco y col., 2018). El exceso de energía es transformado en TAG y almacenado en los adipocitos, los cuales pueden aumentar en tamaño, en número o presentar ambos estados (Parlee y col., 2014). Tanto los adipocitos maduros como la SVF, son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo (Gutiérrez y col., 2012).

2.3.2 Distribución del tejido adiposo

En los organismos superiores los sistemas para almacenar, transformar y utilizar la energía están representados por dos clases de tejido adiposo: blanco y pardo (Hassan y col., 2012; Kwok y col., 2016). El tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) es el principal reservorio de energía (Cinti, 2012; Townsend y Tseng, 2014). El tejido adiposo pardo (BAT) está especializado en la oxidación de la grasa en el proceso de termogénesis, gracias a la presencia de la proteína descopladora del tipo I (UCP-1) una proteína de la membrana interna mitocondrial que disipa el gradiente electroquímico en forma de calor (Giraldt y Villaroya, 2013). Tanto el WAT como el BAT presentan diferentes precursores celulares, fenotipo, función y regulación (Berry y col., 2013). En general, cuando se cita al tejido adiposo se hace referencia al WAT, que es el tejido que está implicado en la obesidad (Giraldt y Villaroya, 2013).

2.3.3 Tejido adiposo blanco

El WAT es el principal órgano almacenador de energía, que actúa como un importante órgano endocrino capaz de secretar diferentes adipocinas. El WAT es un tejido muy diverso, compuesto por diferentes tipos de células, principalmente adipocitos maduros (60-70% del WAT) y SVF como ya mencionó anteriormente. Este tejido contiene una amplia gama de células inmunes como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y otros componentes celulares que forman parte de su función endócrina (Ferrante, 2013). Es importante mencionar que los macrófagos son células que desempeñan un papel de suma importancia en el estado de

obesidad, ya que contribuyen a la producción de mediadores de inflamación en conjunto con los adipocitos (Blancas y col., 2010). Estas células derivan de monocitos circulantes y su número varía directamente con la adiposidad, correspondiendo del 5-10% de las células del tejido adiposo en condiciones normales y hasta casi un 60% en sujetos obesos (Hirai y col., 2010).

Los adipocitos del WAT, son los encargados de almacenar la energía en forma de TAG en gotas lipídicas, por lo cual estas células presentan una morfología típica, en la que dichas gotas de grasa ocupan casi todo el citoplasma (90%) (Giraldt y Villaroya, 2013). Cuando se necesita energía, los TAG son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes salen del adipocito y son transportados hasta otros tejidos donde son utilizados (Guilherme y col., 2008). Otro aspecto importante de su morfología es que los adipocitos blancos carecen de UCP-1 (Scherberich y col., 2013).

2.3.4 Características del tejido adiposo blanco

El WAT se distribuye en distintos depósitos corporales, diferenciándose dos tipos, el tejido adiposo visceral (VAT) en un 20% y el subcutáneo (SAT) en un 80%. El VAT engloba el tejido adiposo omental, mesentérico, retroperitoneal, así como el perigonadal (Wajchenberg, 2000). El SAT se localiza debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo (Shi y Clegg, 2009).

El WAT muestra marcadas diferencias morfológicas y funcionales en relación con su distribución corporal. Así, el VAT, además de tener una mayor actividad metabólica (i.e. transferencia y liberación de ácidos grasos), muestra una menor sensibilidad a la insulina que el SAT (Wajchenberg y col., 2002). Además de esto, ambos tejidos difieren por su capacidad proliferativa y de diferenciación de sus preadipocitos (mayor en SAT), como también en la tasa de apoptosis (mayor en VAT) (Tchkonja y col., 2005). Así como también muestran perfiles de expresión y secreción de adipocinas particulares, incluyendo una mayor producción de adiponectina en SAT (Fain y col., 2003) y de marcadores

proinflamatorios (IL-6 y TNF- α) en VAT (Fain y col., 2003; Vohl y col., 2004). Se sabe que el VAT tiene adipocitos de menor tamaño, se encuentra más vascularizado, con mayor inervación simpática y mayor número de receptores β -adrenérgicos (Vega, 2010).

Finalmente, se ha demostrado que el SAT presenta una menor infiltración de macrófagos, siendo estas diferencias mencionadas aún mayores en un estado de obesidad (Harman-Boehm y col., 2007; O'Rourke y col., 2009). En este contexto, los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento indican que la obesidad visceral está altamente asociada con un mayor riesgo metabólico que la subcutánea de desarrollar resistencia a insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia y enfermedad cardiovascular (Wajchenberg y col., 2002; Snijder y col., 2003; Hamdy y col., 2006).

2.4 La obesidad como un proceso inflamatorio

El consumo de alimentos tiene como primer objetivo cubrir las necesidades energéticas. Sin embargo, si hay un consumo excesivo de grasas y carbohidratos, el organismo los transporta hacia el hígado, en donde son metabolizados a TAG y empaquetados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su transporte a los tejidos extrahepáticos (Talayero y Sacks., 2011). Posteriormente, la lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza a las VLDL liberando ácidos grasos libres los cuales son transportados y almacenados en los adipocitos, re-esterificándose y formando nuevamente TAG (Steinberger y col., 2009). Las dietas hiperenergéticas mantienen una concentración elevada de insulina provocando un estado de hiperinsulinemia, estado que favorece la activación constante de la enzima LPL, aumentando el almacén de TAG en el tejido adiposo (Eckel y Grundy, 2006). Por lo cual, el tejido adiposo puede expandirse por el aumento de volumen de los adipocitos (hipertrofia), por el aumento en la cantidad de adipocitos (hiperplasia) o ambos (Parlee y col., 2014).

La expansión del tejido adiposo provoca un estado de inflamación, derivado de la reducción del abastecimiento de sangre a los adipocitos y, por lo tanto, un inadecuado suministro de oxígeno, promoviendo la infiltración de macrófagos y un aumento en la síntesis de proteínas que inician el proceso de inflamación (citocinas proinflamatorias) como; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), leptina y resistina (Kern y col., 2001). Además de la activación de la expresión de las moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), las cuales promueven el reclutamiento y la adhesión de monocitos circulantes a través del endotelio hasta el tejido adiposo y su posterior diferenciación a macrófagos (Bastarrachea y col., 2007; Blancas y col., 2010).

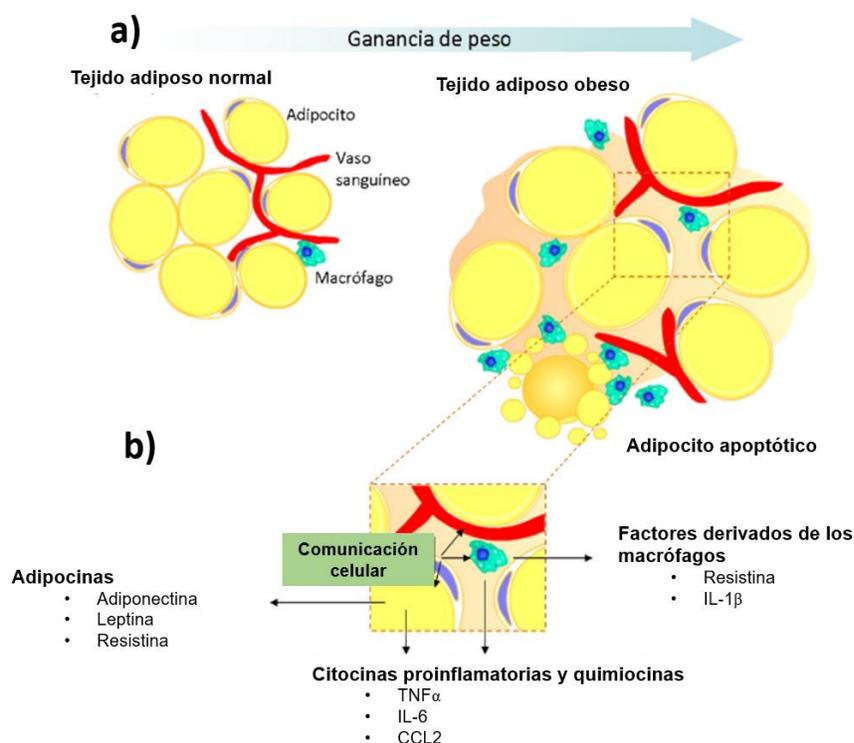


Figura 2. Cambios metabólicos inducidos por una dieta hiperenergética (Adaptada de Tilg y Moschen, 2006). **a)** Con el consumo de dietas con alto contenido energético, los adipocitos presentan hiperplasia, hipertrofia e infiltración de macrófagos, provocando un estado de inflamación. **b)** La respuesta proinflamatoria inicial está controlada por citocinas antiinflamatorias; la resistina e IL-1 β forman parte del mecanismo de defensa ante la acción de quimiocinas como MCP-1 que favorece la conversión de los adipocitos en macrófagos que, a su

vez, contribuye con la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , promoviendo así, una alteración en los niveles de otras adipocinas importantes para el metabolismo como; adiponectina, leptina y resistina.

La acumulación de macrófagos tiene efectos sobre la fisiología de los adipocitos y los preadipocitos; los factores derivados de los macrófagos como TNF- α , modifican el perfil de expresión y secreción de las mismas citocinas proinflamatorias y adipocinas producidas por los adipocitos, promoviendo así, un estado de inflamación local, lo que contribuye a la alteración de los niveles de otras adipocinas como la leptina, resistina y adiponectina, generando un proceso inflamatorio que suele ser crónico de bajo grado hasta la necrosis y muerte del adipocito (Bastarrachea y col., 2007).

TNF- α e IL-6 fosforilan al receptor de insulina (IRS-1) en el tejido adiposo, provocando resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Makki y col., 2013). Por otro lado, disminuye la producción de la adiponectina, una citocina exclusiva del tejido adiposo que ejerce un efecto protector contra la inflamación y la resistencia a la insulina (Figura 2) (Halberg y col., 2008; Fernández-Sánchez y col., 2011; Suganami y col., 2012).

2.4.1 La obesidad y sus complicaciones

La obesidad es una enfermedad crónico-degenerativa que predispone al desarrollo de complicaciones como;

- Resistencia a la insulina: la resistencia a la insulina se genera en respuesta atenuada de los tejidos diana a la insulina, resultando en su incapacidad para proporcionar una homeostasis normal de glucosa (Eckel y Grundy, 2006). Esta resistencia posteriormente puede ocasionar diabetes tipo 2, que se manifiesta como un trastorno metabólico que cursa con hiperglucemia (AHA, 2012).
- Hipertensión arterial (HTA): es un síndrome caracterizado por la elevación persistente de la presión arterial (GPC, 2014). La obesidad

es la principal causa de la HTA, el paciente obeso tiene tres veces más posibilidades que uno no obeso de tener HTA y su prevalencia se incrementa a medida que aumenta la edad y el grado de sobrepeso (Raimann, 2011).

- **Dislipidemias:** son un conjunto de enfermedades resultantes de concentraciones anormales de colesterol, TAG, HDL y LDL en sangre. La obesidad y la dislipidemia se asocian comúnmente, debido a que es altamente frecuente que exista un aumento en los niveles de TAG, colesterol total y LDL y niveles bajos de colesterol HDL cuando el paciente está fuera de su peso normal ($IMC \geq 25$) (Guía de Práctica Clínica, 2016).
- **Esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico:** es la acumulación de lípidos en el hígado en forma de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos (Nagle y col., 2009). Esta acumulación anormal puede ser ocasionada por mayor consumo de grasas en la dieta y liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, ya que la lipasa sensible a la hormona (HLS) es activada debido a la resistencia a la insulina provocando el aumento de lipólisis en el tejido adiposo y liberación de ácidos grasos (Quintero y col., 2016).

2.5 Obesidad y deficiencia de micronutrientes

Los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, son los tres principales macronutrientes que proveen de energía a las células (FAO, 2002). Es por esto por lo que el organismo necesita una mayor cantidad de macronutrientes para funcionar adecuadamente, dependiendo de las funciones del tejido, la célula hace uso específico de cada uno de estos macronutrientes (Miller y col., 2006). El plan nutricional debe trabajarse con un aporte calórico total de: grasas 25–30%, proteínas 15% e hidratos de carbono 55–60%. Las proteínas se indican según las necesidades individuales del individuo y de acuerdo con los requerimientos para su edad. Las grasas que se deben aportar deben mantener

la relación 1:1:1, es decir, 10% saturadas, 10% monoinsaturadas y 10% poliinsaturadas (Bagés, 2013).

Por otro lado, las vitaminas y nutrimentos inorgánicos son nutrientes esenciales que el cuerpo humano requiere en mínimas cantidades, por lo cual se les denomina micronutrimentos (Cano, 2003). Los micronutrimentos se requieren para el funcionamiento adecuado del organismo en diferentes etapas de la vida, debido a su relación con el funcionamiento de varios sistemas, es importante considerar que sus deficiencias pueden tener consecuencias más graves en períodos de la vida que requieren un mayor aporte nutricional, como el embarazo, la lactancia, la infancia y la adolescencia (Gernand y col., 2016).

La deficiencia de micronutrimentos representa la forma de malnutrición más generalizada en el mundo (Bailey y col., 2015). Se estima que más de 795 millones de personas en el mundo sufren distintas carencias de nutrientes (FAO, 2015). Las causas implicadas en la aparición de una deficiencia de micronutrimentos son variadas y pueden agruparse del siguiente modo: a) alteraciones en la ingesta de nutrimentos; b) alteraciones de la digestión y absorción; c) pérdidas extraordinarias de líquidos (i.e orina, drenajes etc.) y d) demandas metabólicas exageradas como un estado de obesidad (Bailey y col., 2015).

Las causas de la obesidad son multifactoriales, sin embargo, la ingesta excesiva de macronutrimentos es uno de los factores que se asocian a la obesidad con más frecuencia, aunado a un bajo consumo de micronutrimentos. El sobrepeso en niños menores de cinco años se está convirtiendo en un problema creciente en la mayor parte de las regiones, y la obesidad en adultos sigue incrementándose en todas ellas. Coexisten, por tanto, distintas formas de malnutrición en países que experimentan al mismo tiempo elevadas tasas de desnutrición infantil y de obesidad en adultos (FAO, 2017).

Por otro lado, el estado nutricional de los adolescentes está determinado por la naturaleza, calidad y proporción de alimentos que consume y esto tiene gran importancia para su desarrollo físico y mental, pues este período se caracteriza

por un crecimiento intenso (Valdez y col., 2012). La mala nutrición que resulta del consumo deficiente de alimentos o nutrimentos se conoce genéricamente como desnutrición, mientras que la mala nutrición que resulta del consumo excesivo de alimentos conduce al sobrepeso o a la obesidad, ambos reconocidos como factores de riesgo de varias enfermedades (Casanueva y col., 2008). La adolescencia constituye una etapa de gran riesgo nutricional debido al aumento de las necesidades metabólicas y fisiológicas, los cambios de hábitos alimentarios y las posibles situaciones de riesgo como actividades deportivas, enfermedades crónicas y embarazos entre otras (Vizmanos y col., 2006; Romero y col., 2006). En esta etapa los requerimientos energéticos y de otros nutrimentos son mucho mayores que en etapas previas debido al intenso crecimiento (Valdez y col., 2012).

Las deficiencias detectadas con más frecuencia en las poblaciones en general son las de vitaminas A, D y E, riboflavina, piridoxina y ácido fólico, respectivamente (Ballesteros y Arés, 2004). La deficiencia de micronutrimentos en individuos obesos no es corregida por una alimentación rica en carbohidratos, lípidos y proteínas de acuerdo con la DRI (ingesta dietética de referencia) (Bagés, 2013).

2.6 Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas presentes en cantidades muy pequeñas en los alimentos, pero indispensables. (FAO, 2015). La deficiencia de vitaminas y nutrimentos inorgánicos afectan a una tercera parte de la población mundial, principalmente a niños y mujeres (Bailey y col., 2015). La carencia del consumo de vitaminas en la dieta y el aumento en la tasa de sobrepeso y obesidad representa actualmente un problema grave de malnutrición en México (Velasco, 2016; FAO, 2017).

2.6.1 Vitamina A

La vitamina A, también conocida como retinol, es una vitamina liposoluble esencial para el ser humano (Landrier y col., 2012). Esta vitamina es un nutriente indispensable para el mantenimiento de la función inmune, el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular, la visión, reproducción masculina y femenina y el desarrollo embrionario (Arakelian, 2010; Al Tanoury, 2013). Esta vitamina se requiere en pequeñas cantidades para llevarse a cabo las reacciones metabólicas de los individuos, ya que se ha descrito que las vitaminas pueden actuar como catalizadores de muchas reacciones químicas (Saeed y col., 2017). La vitamina A es posiblemente la vitamina más multifuncional en el cuerpo humano y es esencial para la supervivencia humana, desde la embriogénesis hasta la edad adulta. La diversidad de las funciones biológicas de la vitamina A y sus derivados es asombrosa y aún no se conoce por completo. La base química de esta versatilidad es la transformación de la vitamina A en un grupo de compuestos relacionados (Kawaguchi y col., 2015).

2.6. 1.1 Fuentes de vitamina A

La vitamina A es un retinoide natural, los retinoides se deben adquirir a partir de la dieta como retinol preformado o como carotenos (Penniston y Tanumihardjo, 2006). Este nutriente está disponible fácilmente a partir de una diversidad de alimentos de origen vegetal y animal, por ejemplo, la vitamina A se puede conseguir en suplementos de origen vegetal en forma de carotenos (NIH, 2018). Los carotenos (provitamina A) son compuestos pigmentados de color amarillo, naranja y rojo presentes en las plantas, los cuales se pueden convertir dentro del cuerpo en vitamina A. El β -caroteno, es el más importante en la dieta humana y se encuentra presente en zanahorias, mangos, calabazas y otras frutas y verduras de color naranja-amarillo (Rhee y col., 2012; Acharya 2018). El retinol preformado se ingiere principalmente en forma de retinol o ésteres de retinol a partir de productos de origen animal como; mantequilla, huevo, leche y carne (con una abundancia especialmente alta en el hígado) o productos

enriquecidos con β -carotenos (NIH, 2016; Rhee y col., 2012). Se ha estimado que las personas consumen aproximadamente un 70 a 90% del retinol dietético total proveniente de los β -carotenos, y el resto a partir del retinol preformado (Penniston y Tanumihardjo, 2006).

2.6.1.2 Equivalencias de retinol y β -carotenos

Anteriormente, las cifras recomendadas de vitamina A se expresaban en UI (Unidades Internacionales) (FAO, 2004). Actualmente se aconseja que la ingesta de vitamina A se exprese como equivalentes de retinol (ER) (OMS, 2014). Este equivalente representa la suma del retinol proveniente de los alimentos de origen animal, más el retinol que deriva de la conversión de los β -carotenos (Arakelian, 2010). Una UI de vitamina A equivale a 0.3 μg de retinol o bien 0.3 ER, por lo tanto, un ER equivale a 3.33 UI de retinol o 6 μg de β -caroteno (FAO, 2004; Arakelian, 2010; OMS, 2014; NIH, 2018).

2.6.1.3 Ingesta, déficit y exceso de vitamina A

La ingesta de vitamina A que el ser humano requiere depende de su edad y etapa reproductiva. La cantidad dietética recomendada de vitamina A (RDA, por sus siglas en inglés) para adultos es de 700 a 900 μg o bien 3000 UI de retinol. Esto es equivalente a 10800 μg de β -carotenos provenientes de los alimentos. Las madres lactantes necesitan cantidades mayores que varían entre 1200-1300 μg , en cuanto a los niños menores de 18 años, requieren cantidades de 350 a 600 μg aproximadamente (FAO, 2004; OMS, 2014; NIH, 2018).

Cuando la dieta tiene un contenido bajo de retinol, se combina con una mala absorción y un aumento de las tasas de excreción, coloca al individuo en una situación de riesgo de desarrollar deficiencia de vitamina A (Stephensen 2001; Acharya 2018). A nivel mundial, la población más vulnerable a esta deficiencia nutricional y sus consecuencias adversas para la salud, son los niños en edad preescolar y las mujeres en edad reproductiva (NIH, 2018). Muchos órganos

dependen de la acción de la vitamina A; sin embargo, el ojo sigue siendo el órgano más sensible a la deficiencia de esta vitamina (Zhong y Sun, 2015). Esta deficiencia se asocia con patologías que pueden llevar a la ceguera nocturna, enfermedades respiratorias, inmunodeficiencias y trastornos en el crecimiento (OMS, 2014; Wiseman, 2016). Por otro lado, si se toma en exceso vitamina A, pueden presentarse efectos indeseables como; engrosamiento irregular de algunos huesos largos, osteoporosis, fracturas óseas, infecciones del tracto respiratorio, agrandamiento del hígado, cambios en la piel y caída del cabello (Grotto y col., 2003; Penniston y Tanumihardjo, 2006; NIH, 2018). Se sabe que una ingesta alta de ácido retinoico es teratogénica tanto para los modelos animales como para los humanos (Rothman y col., 1995).

2.6.1.4 Almacenamiento de los retinoides

La capacidad de almacenar retinoides proporciona a los organismos un beneficio evolutivo en tiempos de insuficiencia de retinol de la dieta, ya que los retinoides almacenados se pueden movilizar en respuesta a las demandas corporales (O'Byrne y Blaner, 2013). Los ésteres de retinol son la forma de almacenamiento de retinoides predominante en el cuerpo; los individuos sanos almacenan aproximadamente del 80 al 90% de retinoides como ésteres de retinol en el hígado (Blaner y Li, 2014). El palmitato de retinol, el oleato de retinol, el estearato de retinol y el linoleato de retinol, representan aproximadamente el 70-80% de los ésteres de retinol total almacenados en el hígado (Goodman y col., 1965; Tanumihardjo y col., 1990). Dentro del hígado, existen dos tipos de células hepáticas que son fundamentales para el metabolismo y almacenamiento de los retinoides; las células parenquimatosas (hepatocitos) y las células estrelladas hepáticas no parenquimatosas (CEH por sus siglas en inglés) (Blaner y col., 1985; Blomhoff y col., 1985). Los hepatocitos constituyen aproximadamente dos tercios de todas las células hepáticas (Geerts, 2001; Friedman, 2008). Los hepatocitos son los responsables de la mayoría de los procesos metabólicos del hígado: son los sitios celulares de eliminación de retinoides de la dieta y, por lo

tanto, responsables de la absorción de retinol (Blomhoff y col., 1982; Abumrad y Davidson, 2012). Si bien los hepatocitos son importantes para la absorción y movilización del retinol, contienen solo 10-20% del retinoide total encontrado en el hígado (Batres y Olson 1987; Blomhoff y col., 1988). El 80-90% restante del retinoide hepático se encuentra en las células madre hematopoyética (HSC por sus siglas en inglés) (Blaner y col., 1985; Batres y Olson 1987).

El tejido adiposo, específicamente el adipocito, es otro sitio para el almacenamiento de retinoides en el cuerpo, aunque en menor medida que los hepatocitos y las HSC (Tsutsumi y col., 1992). Además de su papel en el almacenamiento de retinoides, los ésteres de retinol sirven como sustrato para la formación del cromóforo visual 11-*cis*-retinal, que es necesario para la formación de pigmentos visuales en el ojo (Figura 3) (O'Byrne y Blaner, 2013). Hasta ahora, los ésteres de retinol además de sus funciones en cuanto a almacenamiento y síntesis visual de cromóforos no tienen otras funciones biológicas conocidas (O'Byrne y Blaner, 2013; Li y col., 2014).

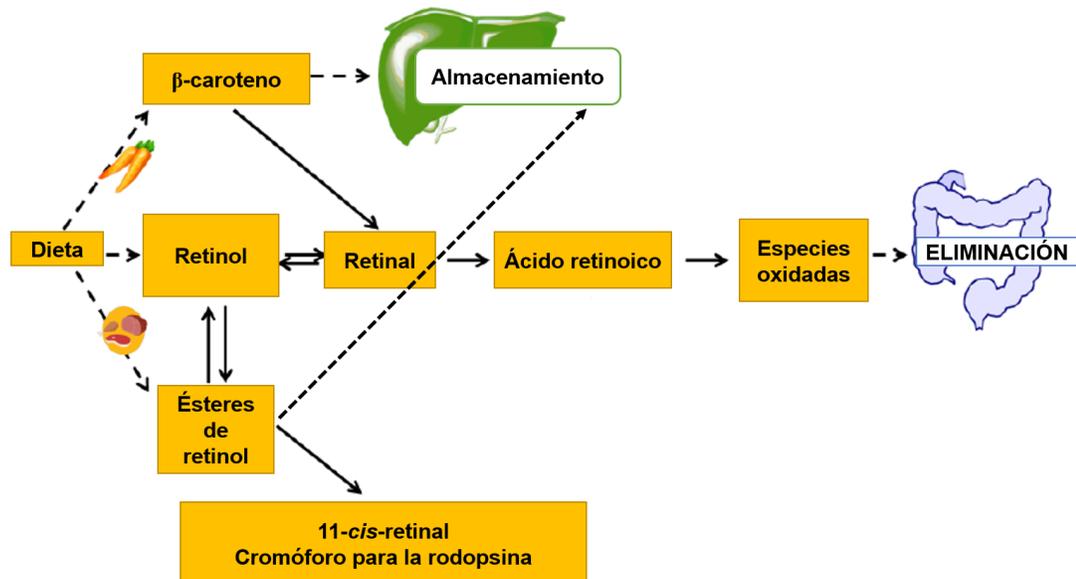


Figura 3. Esquema generalizado para el metabolismo de los retinoides (Modificada de Li y col., 2014). Los ésteres de retinol, el retinol y la provitamina A (β -caroteno) se incorporan al organismo. El retinol puede esterificarse en ésteres de retinol y almacenarse. En tiempos de insuficiencia de retinoides en la dieta, las reservas de ésteres de retinol se hidrolizan a retinol

para su administración a los tejidos periféricos. Tanto el retinol como el β -caroteno se pueden convertir enzimáticamente a retinal (también conocido como retinaldehído). Sin embargo, el cromóforo visual 11-*cis*-retinal, se forma a través de la hidrólisis enzimática de los ésteres de retinol. La retina se puede oxidar enzimáticamente a ácido retinoico o se puede reducir enzimáticamente a retinol. Cuando el ácido retinoico ya no es necesario, se cataboliza y elimina del cuerpo.

2.6.1.5 Metabolismo de los retinoides

El metabolismo de la vitamina A responde a los mismos mecanismos generales de digestión y absorción de las sustancias lipídicas y se puede representar en el siguiente marco: la absorción de vitamina A se realiza primeramente en el estómago en forma de β -carotenos, retinol o ésteres de retinol provenientes de la dieta, los cuales se encuentran en glóbulos lipídicos necesarios para su incorporación; posteriormente se activan señales para la liberación de sales biliares y lipasas que se encargaran de romper a los glóbulos, dando paso a la solubilización de estas moléculas y posterior formación de las estructuras micelares (Olson, 1994). Estas micelas actúan como emulsificadores rodeando a los retinoides para su transporte en el intestino delgado e incorporación en la mucosa intestinal (Chacón y Esquivel, 2013). Lo que quiere decir que los retinoides se encuentran disueltos en grasa (colesterol, ácidos grasos, TAG y fosfolípidos) de los alimentos y sales biliares (O'Byrn y Blaner, 2013).

Una vez incorporados los retinoides en las células intestinales (enterocitos), son asimilados junto con las grasas y pasan a los vasos linfáticos, donde son recogidos y empaquetados en quilomicrones (Alminger, 2012; O'Byrn y Blaner, 2014). Estos quilomicrones transportan al retinol por medio de la circulación, a partir de su incorporación en el torrente sanguíneo se distribuyen al hígado donde se almacenan (Figura 4) (Berry y col., 2013). La absorción y la conversión de los retinoides en el cuerpo es afectada por diversos factores como su estructura molecular, propiedades fisicoquímicas y su contenido lipídico (Deming y col., 2002). Según las necesidades, los β -carotenos una vez convertidos en retinoides

deben metabolizarse posteriormente para el almacenamiento y/o la producción de derivados de retinoides biológicamente activos (Li y col., 2014).

Después del consumo de una comida rica en retinoides, la circulación postprandial puede contener niveles de ésteres de retinol de 5 a 10 μM , con concentraciones exactas que dependen directamente de la cantidad de retinoide consumido, mientras que las concentraciones de ésteres de retinol en la circulación en estado de ayuno varían, pero generalmente se encuentran en el rango de 100-200 nM (O'Byrne y Blaner, 2013). Estudios en la década de 1960 en roedores establecieron que aproximadamente 66-75% de los ésteres de retinol empaquetados en quilomicrones, es absorbido por el hígado, mientras que el 25-33% restante de los ésteres de retinol empaquetados se administra a los tejidos periféricos, evitando su almacenamiento en hígado (Goodman y col., 1965).

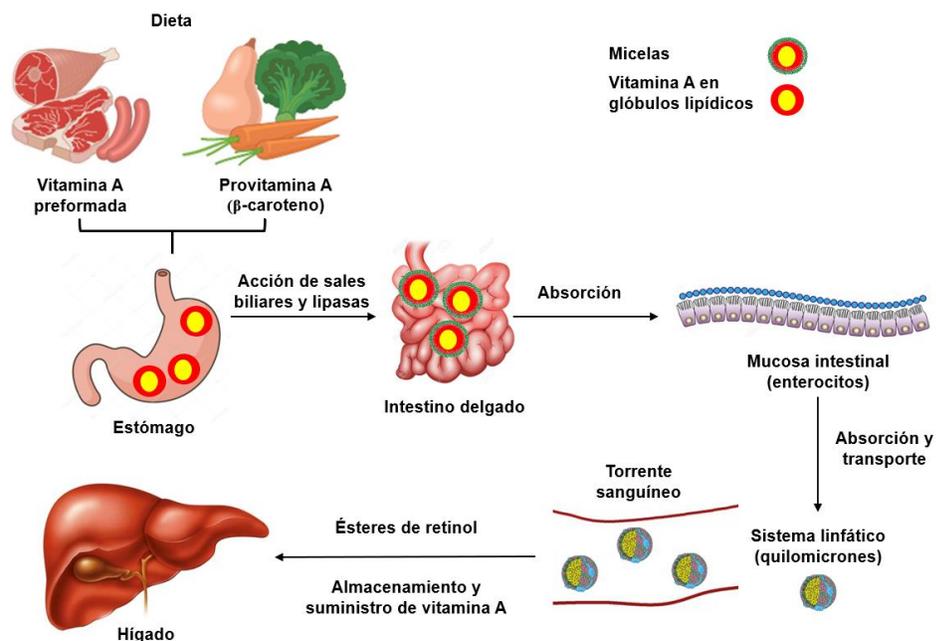


Figura 4. Diagrama del proceso de absorción y distribución de los retinoides (Modificada de Chacón y Esquivel, 2013). Los retinoides provenientes de la dieta, ya sea en forma de retinol, ésteres de retinol y provitamina A, son absorbidos en el intestino delgado. Por acción enzimática, los retinoides son transformados a retinol, los cuales son empaquetados en quilomicrones y secretados al sistema linfático. Los ésteres de retinol empaquetados se someten

a lipólisis al atravesar la circulación. A partir de ahí, los ésteres de retinol pueden tomar uno de dos caminos: (I) pueden hidrolizarse en retinol (a través de la acción de la LPL), los cuales pueden ser absorbidos por los tejidos periféricos; o (II) pueden ser transportados al hígado.

2.6.1.6 Transporte de los retinoides en la circulación

Los ésteres de retinol tras su absorción intestinal son transportados en los quilomicrones hacia el hígado, en donde son hidrolizados a retinol para permitir su distribución por todo el cuerpo, a través de la proteína que une al retinol-4 (RBP-4) (O'Byrne y Blaner, 2013). RBP-4 es una adipocina sintetizada principalmente en el hígado y tejido adiposo, cuya función conocida es transportar el retinol del hígado, lugar en donde se almacena la mayor parte de los retinoides que proviene de la dieta a la circulación (Soprano y col., 1986; Tsutsumi y col., 1992; Kane y col., 2008). En presencia de retinol, RBP-4 se une formando un complejo conocido como holo-RBP4 (RBP-4 con retinol) y es la forma en la que se encuentra generalmente en el plasma, si bien también, puede encontrarse como apo-RBP4 (RBP-4 sin retinol). En ambos casos, RBP-4 circula unido a la transtiretina (TTR) formando un complejo de mayor peso molecular, esta unión de la TTR a holo-RBP4 estabiliza el complejo en la circulación, además de prevenir la filtración renal y permitiendo que RBP-4 se recicle después de que el retinol es tomado por las células (Figura 5) (Combs, 1992; Naylor y Newcomer, 1999; Prapunpoj, 2009).

Cuando el retinol es entregado a las células dianas, el retinol cruza la membrana plasmática por difusión simple o a través de un receptor específico para RBP4 (CRBP II), una vez separado del retinol, la RBP4 pierde su afinidad por la TTR, vuelve a la circulación como apo-RBP4 y es eliminado a través de los riñones. En las células dianas el retinol es metabolizado a RA y se une a los receptores nucleares como RAR RXR para promover la transcripción de genes (Figura 6) (Lee y Jeong, 2012).

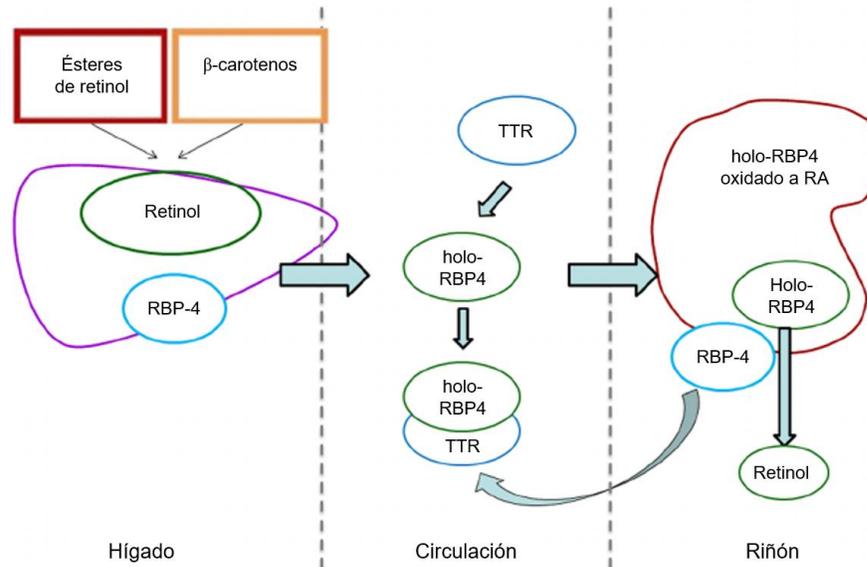


Figura 5. Metabolismo y transporte de la vitamina A en la circulación (Modificada de Manickavasagar y col., 2015). En individuos sanos, la vitamina A proveniente de la dieta se convierte en retinol, el cual se almacena en el hígado y es transportado por RBP4 y TTR a las células diana como holo-RBP4-TTR. La holo-RBP4 se oxida a su forma activa; el ácido retinoico (RA por sus siglas en inglés), quedando libre la RBP-4 la cual se degrada y filtra por los riñones.

La TTR antes conocida como prealbúmina, es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas, a pesar de que cada uno de los cuatro monómeros tiene un sitio de unión para RBP-4, el tetrámero liga sólo a una molécula de RBP-4 con alta afinidad y posiblemente a una segunda con menor afinidad (Monaco, 2000). La afinidad de unión para apo-RBP es muy baja, y la pérdida de retinol (por ejemplo, por la absorción por los tejidos) da como resultado la separación y excreción renal de apo-RBP, lo que sugiere una vida media biológica tan corta de 3.5 horas (Noya y col., 2015). Aproximadamente el 95% de los retinoides presentes en la circulación en el ser humano en un estado de ayuno, existen en forma de holo-RBP4, con concentraciones normales de aproximadamente 2-4 μM en los adultos (O'Byrne y Blaner 2013).

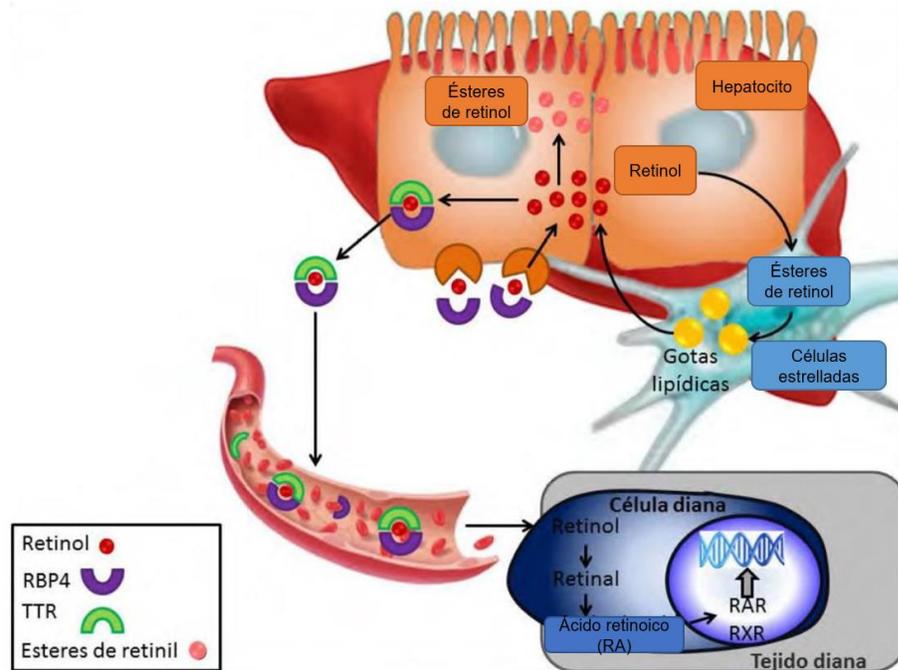


Figura 6. Transporte y almacenamiento de retinol (Modificada de Elías. 2013). El complejo holo-RBP4 se secreta desde el hepatocito a la circulación para permitir la administración de retinol a los tejidos periféricos dependientes de retinoides, donde se puede oxidar a ácido retinoico, el cual se une a los RAR y RXR. La activación de RAR por la unión del RA desencadena el reclutamiento de correguladores transcripcionales que permiten la transcripción de genes.

2.6.1.7 Estructura de los retinoides

La vitamina A existe en tres formas químicas principales: retinaldehído, retinol y ácido retinoico (O'Byrne y Blaner, 2013; Vales y col., 2016). Existen otras formas de vitamina A, pero tienen configuraciones moleculares distintas, lo que les confiere menor actividad biológica que al retinol como por ejemplo los ésteres de retinol. Algunos de ellos a pesar de su menor actividad son de suma importancia para el organismo (Rhee y col., 2012). A esta familia de moléculas con estructura similar, ya sean endógenos o sintéticos, se les denomina retinoides (Wang y col., 2014). Los retinoides han sido apreciados durante mucho tiempo como un factor crucial para controlar el programa de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, así como su intervención en muchos procesos fisiológicos esenciales ya mencionados (Li y col., 2014; Kelly y von Lintig, 2015).

Químicamente el retinol es un isoprenoide ya que se sintetiza principalmente a partir del β -caroteno, el cuál es un derivado del isopreno. Los isoprenoides son moléculas esenciales presentes en las plantas que se sintetizan a partir de unidades de isopreno (Kelly y von Lintig, 2015). Estas unidades contienen en su estructura un anillo β -ionona, un grupo polar, por lo cual son moléculas poco solubles en agua y una cadena poliinsaturada (Curley., 2012). La cadena poliinsaturada es un sistema conjugado formado por enlaces dobles alternos, responsable del color de los retinoides (típicamente amarillo, naranja o rojo), por lo tanto, muchos retinoides son cromóforos (Kelly y von Lintig, 2015). La variedad en la alternancia de los dobles enlaces en las cadenas laterales y los grupos terminales crea las diversas clases de retinoides (Wiseman, 2016). El retinol al ser una molécula hidrocarbonada con un solo grupo hidroxilo en un extremo, puede presentar varios isómeros, ya que el grupo hidroxilo se puede oxidar fácilmente para formar retinaldehído, ácido retinoico o ésteres de retinol (Figura 7) (Rhee y col., 2012).

El retinaldehído y el ácido retinoico son las formas biológicamente activas del retinol, sin embargo, el retinol se almacena en el hígado como ésteres de retinol, los cuales no presentan actividad biológica conocida, pero son la forma más abundante de almacenamiento en el cuerpo (O'Byrne y Blaner, 2013). La forma más común de ésteres de retinol en el organismo es el palmitato de retinol, el cual se convierte en retinol en el intestino delgado (FAO, 2004; Wiseman, 2016). Es importante mencionar que la única fuente de retinoides para la mayoría de los animales es a partir de la dieta, ya que estos compuestos no pueden sintetizarse de *novo* (Rhee y col., 2012). La función principal del retinol y los ésteres de retinol es servir como precursores para la biosíntesis de retinoides biológicamente activos (Dawson y Xia, 2012). Es importante dejar claro que, cuando se cita al ácido retinoico (RA), se hace referencia al ácido todo-*trans*-retinoico (atRA), por lo cual, tanto atRA y RA se utilizarán indistintamente. Durante el desarrollo del individuo, el RA regula la diferenciación celular y durante la vida adulta es importante para mantener la inmunidad y la fertilidad de manera saludable, así como para regular la proliferación celular (Suwa y col., 2016).

Además de los diferentes estados de oxidación del retinol mostrados, existen metabolitos de atRA de gran interés; el ácido 9-*cis*-retinoico y el ácido 13-*cis*-retinoico (Rhee y col., 2012; Dawson y Xia, 2012). Estos isómeros también forman parte del grupo de los retinoides y juegan un papel importante en la neurogénesis y la supervivencia de las células adultas y contribuyen a la regulación de la homeostasis de la glucosa (Dawson y Xia, 2012).

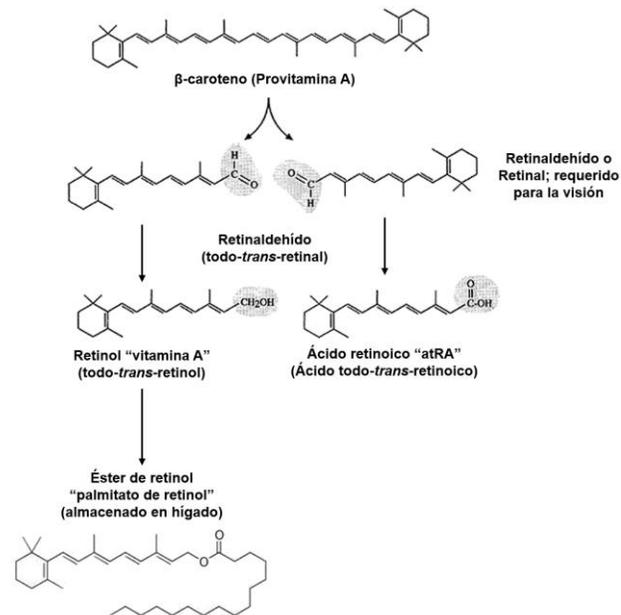


Figura 7. El retinol y sus principales metabolitos (Modificada de Kelly y von Lintig, 2015). La vitamina A es un nutriente esencial que se encuentra presente en el organismo en diferentes formas químicas. Mediante la modificación enzimática de los grupos funcionales y la isomerización geométrica de la cadena poliinsaturada del β-caroteno, dan origen a los diferentes retinoides. Estos retinoides desempeñan papeles críticos a lo largo del ciclo de la vida de los vertebrados, por lo que se requieren para fines específicos en los diferentes tejidos.

Aunque la función fisiológica del ácido 13-*cis*-retinoico aún no es muy clara, se utiliza como un medicamento contra el acné y se le conoce con el nombre de isotretinoína (Rhee y col., 2012). El isómero derivado del retinol, 11-*cis*-retinal es de gran importancia ya que es esencial para el funcionamiento del ojo como ya se mencionó anteriormente (Al Tanoury y col., 2013). Los isómeros

del retinol y de atRA son constituyentes normales en el suero de los seres humanos (Kelly y von Lintig, 2015).

2.6.1.8 Mecanismo de acción de los retinoides

Los retinoides debido a su baja solubilidad en solución acuosa y su inestabilidad relativa, requieren proteínas transportadoras para su biodisponibilidad, estabilidad y transporte (Nossoni y col., 2014). Existen diferentes proteínas en distintos tejidos que desempeñan papeles importantes en el transporte, almacenamiento y metabolismo de la vitamina A (Banaszak y col., 1994). Así, además de la RBP-4, hoy se conocen las proteínas de unión al ácido retinoico celular (CRABP I y II), proteínas de unión a retinol celular (CRBP I y II), proteína celular de unión a retinal (CRALBP) y proteína que une retinol interfotoreceptor (IRBP). Las estructuras de las proteínas en esta familia son bastante similares, el ligando retinoide en todas estas proteínas se une de forma no covalente y con alta afinidad (Veerkamp y col., 1993; Banaszak y col., 1994).

Hasta el momento se sabe que los efectos biológicos de los retinoides dependen de dos tipos de familias de receptores: receptores citoplasmáticos y receptores nucleares, estos últimos divididos a su vez en dos subtipos, los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X de los retinoides (RXR) (Lefebvre y col., 2010).

2.6.1.8.1 Receptores citoplásmicos

Consisten en una super familia de pequeñas proteínas citosólicas transportadoras de retinol (CRBP I y II) y de RA (CRABP I y II) (Lefebvre y col., 2010). La distribución de estas moléculas varía en los distintos tejidos, así las CRABP I y II tienen una localización cutánea y se detectan en el citoplasma de queratinocitos y fibroblastos. Por el contrario, las CRBP I y II son más abundantes en los tejidos del aparato genito-urinario y gastrointestinal (Menozzi y col., 2017). CRBPI y CRBPII comparten aproximadamente el 56% de identidad de secuencia

(Li y col., 2014) y ambas proteínas pueden unirse al retinol, retinaldehído y 13-*cis*-retinol, mientras que ninguna se une al 9-*cis*-retinol (Rosen y MacDonald, 2006). Hasta ahora se ha determinado que CRBP II es el más selectivo para todos los retinoides (Nossoni y col., 2014).

2.6.1.8.2 Receptores nucleares; RAR y RXR

Los retinoides tienen una gran afinidad por los RAR y RXR, los cuales como ya se mencionó, son miembros de la familia de receptores nucleares con amplias funciones biológicas como; regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Pauling, 2018). Los RAR al igual que los RXR, están codificados por tres genes; α , β y γ , por lo que se generan tres isoformas de cada uno: RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β y RXR γ (Tyagi y col., 2011). Ambos receptores actúan como factores de transcripción dependientes de ligando que se unen a la región promotora de numerosos genes diana, provocando su estimulación o represión transcripcional (Lefebvre y col., 2010). Se ha reportado que la forma en cómo actúan estos receptores es por medio de la formación de homodímeros que son complejos con dos unidades de la misma proteína (RAR/RAR o RXR/RXR) o bien heterodímeros (RAR/RXR) que reconocen secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE, por sus siglas en inglés) y elementos de respuesta X del retinoide (RXRE) (Figura 8), localizadas dentro del promotor de genes retinoide-sensibles (Pauling, 2018). En presencia del ácido 9-*cis*-retinoico, el homodímero RXR-RXR puede activar la transcripción génica (Kane, 2011; Grygiel-Górniak, 2014). La transcripción de estos genes luego induce la inhibición del crecimiento y diferenciación celular (Martin, 2010).

La actividad transcripcional de los heterodímeros RAR/RXR parece estar basada principalmente por la unión de RA al RAR (α , β , o γ) (Dawson y Xia, 2012; Menozzi y col., 2017). Los RAR α , RAR β y RAR γ , se unen tanto al RA como al ácido 9-*cis*-retinoico, mientras que RXR α , RXR β y RXR γ se unen solo al ácido 9-*cis*-retinoico (Martin, 2010). El ácido 13-*cis*-retinoico no es un ligando para

receptores de retinoides, pero puede convertirse fácilmente en ligando de receptor de retinoides mediante una isomerización (Menozzi y col., 2017).

La activación de los RAR por la unión del RA desencadena el reclutamiento de correguladores transcripcionales que apuntan a los promotores, inhibiendo o permitiendo la transcripción de genes (Lefebvre y col., 2010). El RXR además de los RAR, también puede formar heterodímeros con otros varios receptores nucleares, incluyendo el receptor de hormona tiroidea (TR), el receptor de vitamina D (RVD), receptores de esteroides, y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (Bruedigam y col., 2008). De esta manera, la vitamina A pudiese interactuar con los receptores ya mencionados en rutas de señalización e influenciar la transcripción de una amplia gama de genes (Pauling, 2018).

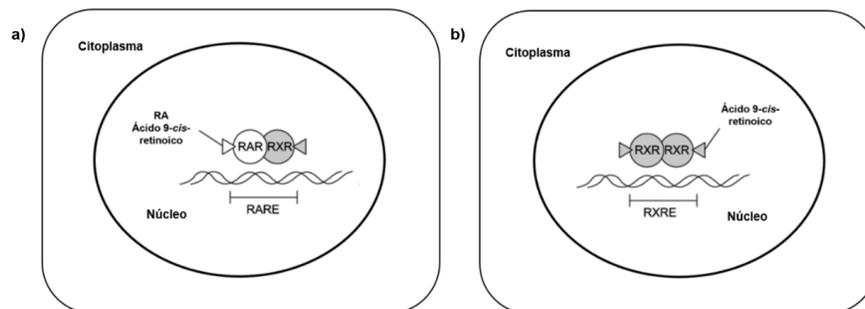


Figura 8. Regulación de la expresión de genes por retinoides (Modificada de Pauling, 2018). a) RA y el ácido 9-cis-retinoico son transportados al núcleo de la célula unidos a las proteínas de unión a ácido retinoico citoplásmicas (CRABP). Dentro del núcleo, el RA se une a los RAR, los RAR y los RXR forman el heterodímero RAR/RXR, el cual se unen a regiones reguladoras de los cromosomas (RARE). b) De la misma forma, la unión del ácido 9-cis-retinoico a los RXR, da origen al homodímero RXR/RXR el cual es capaz de regular la tasa de transcripción de genes.

2.6.1.8.3 Receptor PPAR γ

PPAR γ pertenece a la familia proteica de receptores nucleares que son una clase de proteínas intracelulares que, en respuesta a ligandos específicos

(naturales o sintéticos) provenientes del exterior, tienen la capacidad de unirse directamente al ADN para regular la expresión génica (Martin, 2010).

Existen tres isoformas de los PPAR's; los PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , cuya expresión es tejido-específica (Salmerón, 2018). PPAR α se expresa fundamentalmente en el hígado, riñón y músculo esquelético, es decir, en tejidos con una alta capacidad de oxidación de ácidos grasos. PPAR β/δ interviene, entre otros procesos, en el desarrollo e implantación del embrión y se expresa de manera ubicua. PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo blanco y marrón (dos tejidos que almacenan grandes cantidades de ácidos grasos), y en menor medida en las células inmunes (monocitos y macrófagos) por lo que constituye un regulador principal de la diferenciación adipocitaria y participa en la homeostasis de la glucosa (Rhee y col., 2012; Ferré 2018).

Los PPAR's poseen la estructura clásica de un receptor nuclear (Figura 9); tienen una región NH-terminal con un dominio de transactivación independiente de ligando (AF-1), seguido de un dominio de unión al ADN (dos dedos de zinc) y, en el extremo COOH, un dominio de ligando y dimerización y un dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2) (Ferré, 2018).

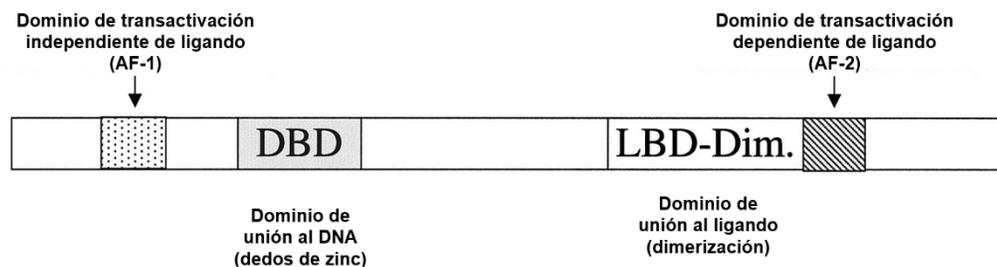


Figura 9. Estructura general de los PPARs (Modificada de Ferré, 2018). Cada receptor nuclear PPAR γ tiene un dominio de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés) y un dominio de unión al ligando (LBD). Tanto el DBD y el LBD son altamente conservados en las tres isoformas PPARs. La divergencia en la secuencia de aminoácidos en LBD es la responsable de la selectividad por los diferentes ligandos.

El RA puede unirse a los RXR que a su vez pueden formar heterodímeros con los PPAR's dentro del núcleo, activando la expresión de diversos genes (Grygiel-Górniak y col., 2014). Po ejemplo; la unión del ácido 9-*cis*-retinoico a los RXR con PPAR es esencial para muchas de las funciones reguladoras de los PPAR's en las células, el cual se une entonces a la región reguladora de varios genes para regular su transcripción (Salmerón, 2018). Este complejo activador (PPAR-RXR) se une al ADN y reconoce una secuencia específica de nucleótidos conocida como elementos de respuesta a PPAR (PPRE, por sus siglas en inglés) (Carvajal y col., 2007). Cuando al heterodímero se unen sus ligandos respectivos, por ejemplo; un ácido graso insaturado de cadena larga al PPAR y el ácido 9-*cis*-retinoico al RXR, se lleva a cabo un reclutamiento proteico activador y se inicia la transcripción del gen (Figura 10) (Grygiel-Górniak y col., 2014). El heterodímero también puede reprimir la transcripción de genes al unirse directamente a las regiones promotoras y ser activados por sus ligandos; en este caso interactúan directamente con represores proteicos de los genes blanco (Grygiel-Górniak y col., 2014).

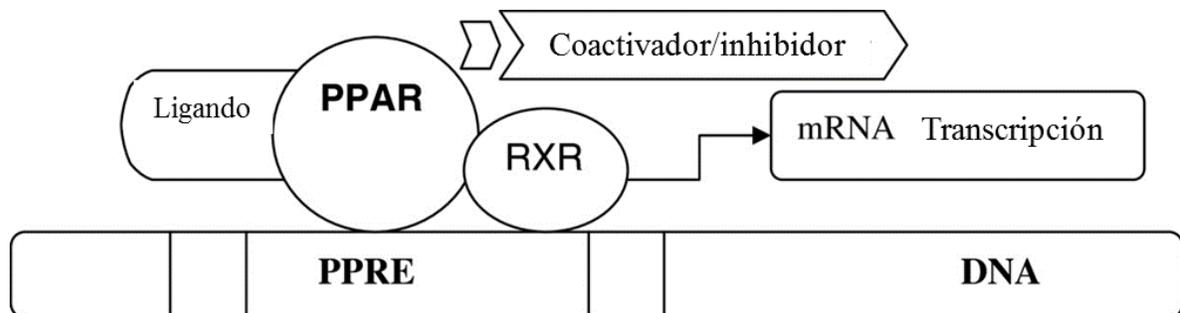


Figura 10. Esquema de la unión de PPAR con RXR para la expresión de genes (Modificada de Grygiel-Górniak y col., 2014). Los PPAR's forma un heterodímero con los RXR dentro del núcleo, y se unen al sitio PPRE del promotor de diversos genes promoviendo la transcripción. El heterodímero puede también reprimir la transcripción de genes al unirse directamente a las regiones promotoras y ser activados por sus ligandos; en este caso interactúan directamente con represores proteicos de los genes blanco.

En contraste con otros receptores nucleares (por ejemplo, los receptores de esteroides), las propiedades de unión de los PPAR's son poco selectivas, ya que

cada PPAR puede aceptar ligandos con estructuras bastante diferentes (Ferré, 2018). El PPAR/RXR puede ser activado por el ligando de cualquiera de los receptores, y la unión simultánea de ambos ligandos es más eficiente para que se lleva a cabo un reclutamiento proteico activador y se inicia la transcripción del gen (Figura 11) (Al Tanoury y col., 2013).

Se han identificado ligandos sintéticos y naturales de PPAR γ , entre los ligandos naturales se encuentran varios ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, así como una prostaglandina llamada 15 deoxy-Delta-12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ) (Ferré, 2018). En presencia de sus ligandos PPAR γ regula la transcripción de genes (Bruedigam y col., 2008). Se tiene claro que los miembros de la familia de compuestos antidiabéticos de tiazolidindiona (TZD) son ligandos de PPAR γ (Grygiel-Górniak, 2014).

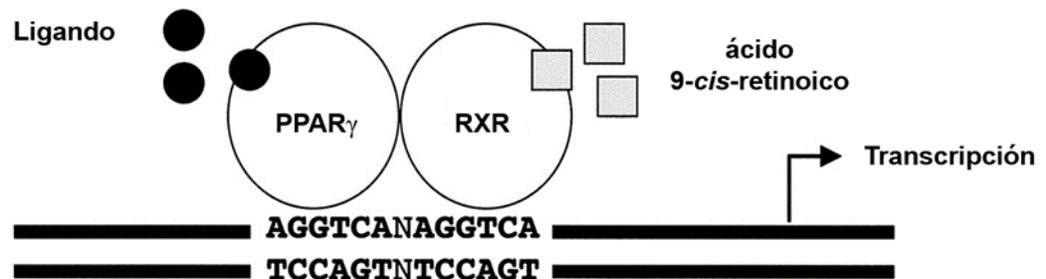


Figura 11. Papel de los receptores PPAR γ y RXR (Modificada de Ahmadian y col., 2013). Los PPAR γ son activados por la unión a ligandos específicos. El heterodímero formado por la unión de RXR y PPAR (PPAR γ -RXR), se une a su región promotora PPPE, alterando procesos de adipogénesis, metabolismo de lípidos y homeostasis de la glucosa mediante la regulación de genes involucrados en dichos procesos.

2.6.1.9 Proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP-4)

La RBP-4, como ya se mencionó anteriormente, es la proteína de transporte para la vitamina A (Li y col; 2014; Kawaguchi y col., 2015). Dentro de sus características; es una proteína transmembranal constituida por 182

aminoácidos, presenta un peso de 21 kDa y está codificada por el gen *rbp4*, localizado en el cromosoma 10q23-q24 (Figura 12) (Esteve, 2014). Pertenece a la familia de las lipocalinas, lo que quiere decir, que todas las proteínas pertenecientes a este grupo (150 aproximadamente), tienen la capacidad de acarrear moléculas lipofílicas tales como vitaminas liposolubles, hormonas esteroideas y tiroideas, ácidos grasos (en especial de cadena larga), ácidos biliares entre otras. Además de su capacidad de unión a receptores de membrana y su capacidad de formar complejos con macromoléculas (García y col., 2007). Esta proteína es sintetizada predominantemente en el hígado y en el tejido adiposo visceral y es almacenada en mayor medida en el hígado, pero su mRNA (ARN mensajero) se puede encontrar en tejidos como: adiposo, riñón y pulmón (García y col., 2007; Polyzos y col., 2016). La función fundamental de RBP-4 es transportar el retinol desde el hígado a los tejidos periféricos (Polyzos y col., 2016; Fedders, 2015).



Figura 12. Estructura de la proteína RBP-4 (Protein Data Bank, 2018). Modelo geométrico de la estructura de RBP-4 en plasma humano, cristalizada por difracción de rayos X.

Desde el descubrimiento de la RBP-4 en 1992, diversos estudios han demostrado que los niveles séricos de RBP-4 están elevados en sujetos con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, enfermedad del hígado graso no alcohólico y síndrome metabólico (Yang y col., 2005; Graham y col., 2006; Yao-Borengasser y col., 2007).

La concentración circulante de RBP-4 se correlacionó positivamente con las medidas de adiposidad y con parámetros inflamatorios en individuos con sobrepeso y obesidad. La concentración circulante de RBP-4 se asoció mayoritariamente con medidas de la circunferencia, cintura y porcentaje de grasa visceral que con el porcentaje de grasa corporal (Tan y col., 2007). La asociación entre RBP-4 y la grasa visceral fue más fuerte que su asociación con el IMC, lo que indica un mayor papel de la grasa visceral que subcutánea en la relación entre RBP-4 y la resistencia a la insulina (Steve y col., 2009). Este hallazgo fue confirmado por otros autores que describieron que la acumulación de tejido adiposo visceral fue el predictor más fuerte de los niveles de RBP-4 (Lee y col., 2007). En este sentido, ya se ha encontrado una mayor expresión de mRNA de RBP-4 en el tejido adiposo visceral, en comparación con el subcutáneo (Klötting y col., 2007).

Diversos trabajos en la literatura se han centrado en investigar los mecanismos de acción de RBP-4 en diferentes patologías. Se ha descrito que RBP-4 por sí misma puede ejercer efectos pro-inflamatorios a través de alterar la producción de otras adipocinas (Graham y col., 2006; Yao-Borengasser y col., 2007; Balagopal y col., 2007; Wu y col., 2016). Se ha observado que niveles plasmáticos elevados de RBP-4 en pacientes obesos, están asociados con el aumento de marcadores inflamatorios como TNF- α y MCP-1 (Graham y col., 2006). Además, RBP-4 afecta la generación de adiponectina en pacientes obesos y en determinadas patologías como la diabetes (Wu y col. 2016).

2.6.1.10 STRA6: Receptor de membrana estimulado por retinol que media la absorción celular de vitamina A de la sangre

A mediados de la década de 1970, se propuso que existe un receptor de membrana para RBP-4 (Heller, 1975; Rask y Peterson, 1976). Este receptor se identificó como STRA6 (receptor de membrana estimulada por ácido retinoico 6), una proteína de la membrana plasmática (Kawaguchi y col., 2007; Berry y col. 2011; Marwarha y col., 2014; Fedders y col. 2015). Este receptor representa una

nueva clase de proteína de transporte de membrana y una nueva clase de receptor de membrana. Se determinó que STRA6 tiene nueve dominios transmembrana, cinco dominios extracelulares y cuatro dominios intracelulares, así como también se identificó un dominio esencial de unión a RBP-4 localizado entre el dominio transmembranal VI y VII (Figura 13) (Kawaguchi y col., 2008).

Las proteínas de membrana que tienen más de siete dominios transmembrana tienden a funcionar como transportadores o canales, la gran cantidad de dominios transmembrana permite la formación de un poro, a través del cual el sustrato (retinol) puede pasar y el transporte puede regularse. STRA6 funciona como un receptor para RBP-4 y un transportador para tomar vitamina A (Kawaguchi y col., 2015). Por lo tanto, la absorción de vitamina A mediada por STRA6 no es un ejemplo

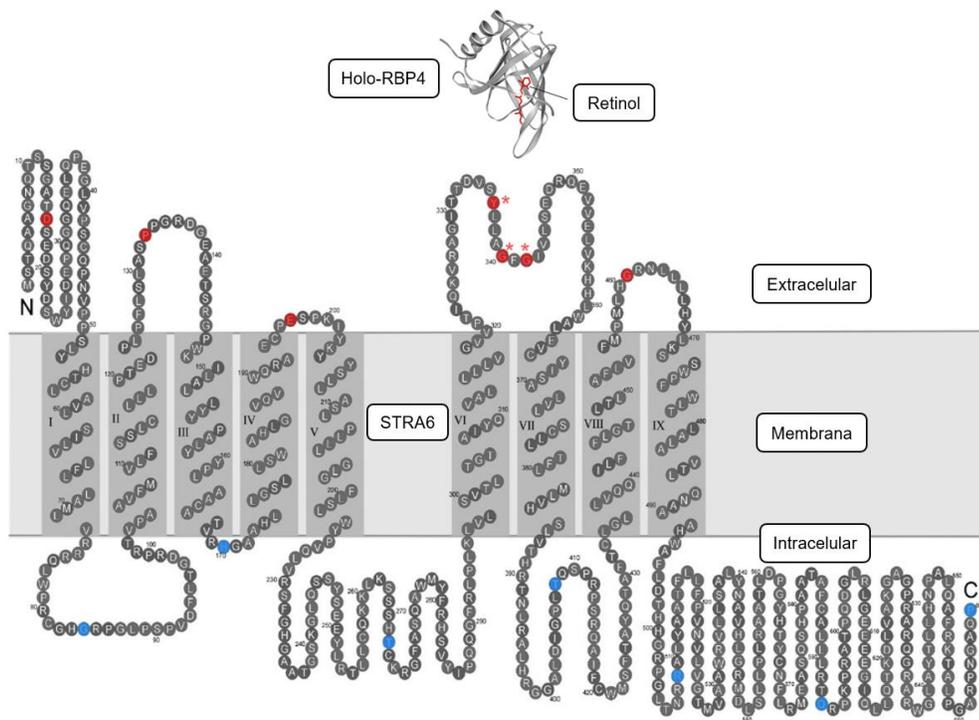


Figura 13. Receptor transmembrana STRA6 (Modificada de Kawaguchi y col., 2015). En el modelo del receptor STRA6 se muestra la unión de holo-RBP4 en el dominio transmembranal VI y VII, así como también se muestran los residuos de aminoácidos que se han confirmado experimentalmente como extracelulares y se encuentran etiquetados de color rojo. Los residuos que se ha confirmado son intracelulares están etiquetados en color azul. Los tres residuos de

aminoácidos esenciales de STRA6 para la unión de RBP-4 están marcados con asteriscos. Una mutación en cualquiera de estos tres residuos es suficiente para suprimir la unión de RBP-4 y la absorción de vitamina A sin afectar la expresión de la superficie de la célula de STRA6.

de transporte activo primario porque STRA6 no tiene un dominio de unión a ATP, el transporte se lleva a cabo mediante un canal facilitador que depende del gradiente electroquímico del ligando que se une al receptor (Kawaguchi y col., 2007; Kawaguchi y col., 2015). Esto quiere decir que STRA6 está unido con alta afinidad a holo-RBP (Figura 14) (Kawaguchi y col., 2011).

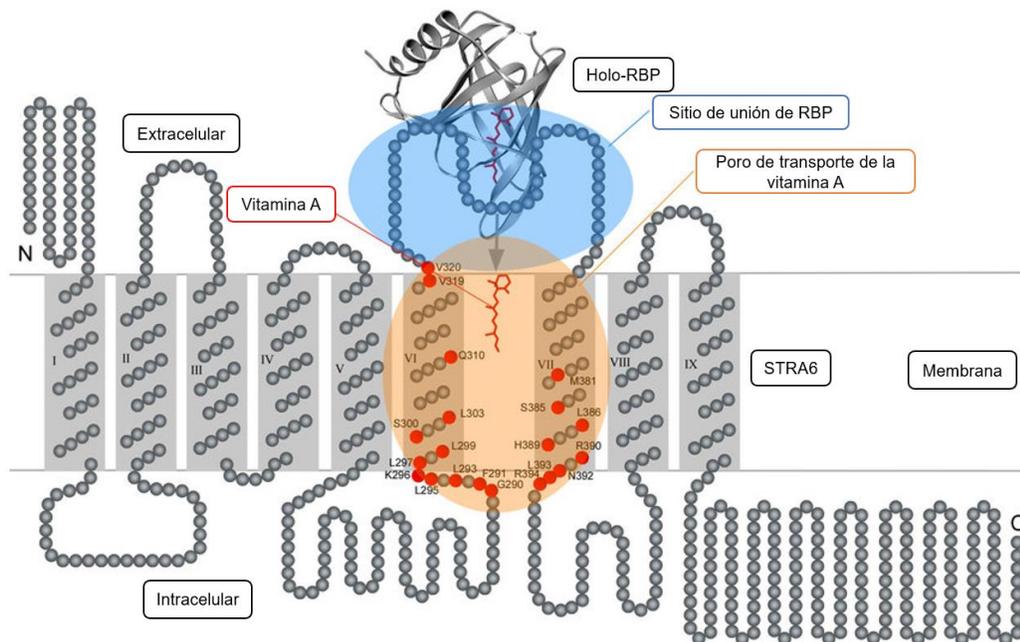


Figura 14. Diagrama de que muestra el modelo transmembrana de STRA6 (Modificada de Kawaguchi y col., 2015). Se muestra el transporte de la vitamina A por medio de STRA6; de color negro se representa la estructura cristalina de holo-RBP. El sitio de unión de holo-RBP con STRA6 está sombreado en color azul. Los dominios transmembrana que se sabe que son parte del poro de transporte de vitamina A están sombreadas en color naranja. Los residuos cuya modificación aguda impide el transporte de vitamina A por STRA6 se representan como círculos rojos.

En algunos tejidos (por ejemplo; tejido adiposo y músculo), la captación de retinol a partir de la sangre también puede estar mediada por la membrana plasmática de STRA6 (Berry y col. 2011; Marwarha y col., 2014; Fedders y col. 2015). Esta proteína se une a holo-RBP extracelular, y posteriormente facilita la disociación del retinol de RBP-4, permitiendo el transporte del retinol a las células (Kawaguchi y col., 2007). Esta absorción de vitamina A también es respaldada por la proteína CRBP I (Ghyselinck y col., 1999). Sin embargo, el mecanismo que se propone por el cual actúa RBP-4 en estado de inflamación es a través de holo-RBP4 extracelular, el cuál es inducido por una fosforilación de STRA6, ya que STRA6 además de servir como una proteína de transporte, funciona como un receptor de adipocinas de superficie celular (Berry y col., 2011; Marwarha y col., 2014). La unión de holo-RBP extracelular induce la fosforilación de STRA6 que a su vez desencadena el reclutamiento y activación de JAK2 (Janus quinasa 2), el cuál cataliza la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio citosólico del receptor y conduce al reclutamiento y activación de STAT5 (transductor de señales y activador transcripcional 5). La activación de STAT5, induce su translocación al núcleo activando la expresión de genes como; SOCS3 (supresor de señalización de citocinas 3) un potente inhibidor de la señalización de insulina, el cual está relacionado con la resistencia a la insulina (Starr y col., 1997; Croker y col., 2008), así como la expresión de PPAR γ , el cual tiene un papel crítico en el proceso de adipogénesis (Figura 15) (Berry y col., 2011; Berry y col., 2013).

Es importante aclarar, que la asociación de holo-RBP4 con TTR previene la unión de holo-RBP a STRA6, por lo que STRA6 media la captación de vitamina A y la señalización celular solo cuando el nivel de holo-RBP excede al de TTR (Berry y col., 2012).

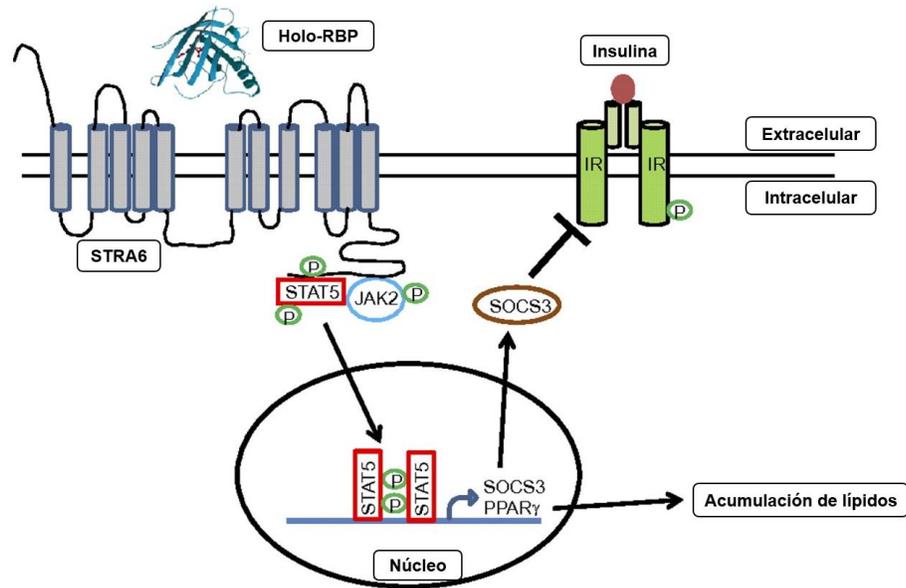


Figura 15. Mecanismo de RBP-4 en la activación de SOCS3 y PPAR γ (Adaptada de Berry y col., 2011). STAT5 que es activado por la unión del complejo holo-RBP a STRA6 y su posterior fosforilación por JAK2 se transloca al núcleo, regulando genes como SOCS3 que inhibe la señalización de la insulina y PPAR γ , que aumenta la acumulación de lípidos.

Se ha demostrado que la unión de STRA6 con holo-RBP, así como la activación de la señalización de JAK2/STAT5 son interdependientes; es decir, que se requiere la transferencia directa de holo-RBP extracelular a CRBP-I intracelular para desencadenar la fosforilación de STRA6 y que, a su vez, la fosforilación de STRA6 es crítica para el transporte de retinol por el receptor (Berry y col., 2012; Kawaguchi y col., 2015). Estas observaciones sugieren que los factores que controlan el transporte de retinol mediante el receptor STRA6, también pueden controlar la señalización de este (Marwarha y col., 2014). Uno de estos factores es la tasa de metabolismo de retinol, que es importante porque el retinol entra en las células por un proceso pasivo, siguiendo un gradiente de concentración mantenido por las conversiones metabólicas (Marwarha y col., 2014; Kelly y von Lintig, 2015; Kawaguchi y col., 2015). El transporte de retinol mediado por STRA6 puede ser especialmente sensible a los cambios en las tasas

metabólicas debido a la necesidad obligatoria de este proceso para la regeneración de apo-RBP (Kelly y von Lintig, 2015).

Para comprender mejor la relación entre la señalización de STRA6 y el metabolismo de retinol intracelular, es importante mencionar a “LRAT” (Lecitin Retinol Acil Transferasa), una enzima cuyo papel es catalizar la conversión del retinol a ésteres de retinol. Es una proteína de membrana del retículo endoplásmico de 25 kDa (D’ Ambrosio y col., 2011). LRAT estimula la actividad de STRA6 y es importante para el transporte de retinol a través de la membrana celular (Kawaguchi y col., 2007; Isken y col., 2008). La proteína CRBP I se une y solubiliza al retinol dentro de la célula, por lo que es otra proteína asociada con el almacenamiento de vitamina A que puede afectar la función de STRA6 (Kawaguchi y col., 2011) (Figura 16). El receptor STRA6 entrega el retinol que transporta a la proteína CRBP I, lo que sugiere que debe existir algún otro factor además de la capacidad de unión al retinol para potenciar la actividad de STRA6 (Kawaguchi y col., 2011; Isken y col., 2008). Ya que se tiene evidencia de que cuando LRAT y CRBP I no están presentes, la captación de retinol por STRA6 es muy baja (Isken y col., 2008; Kawaguchi y col., 2011). Aunque no se ha identificado un sitio de unión para CRBP I en la proteína STRA6, probablemente estaría ubicado en la región C-terminal de STRA6 (Zhong y col., 2014).

Marwarha y col., utilizando modelos con ratones y cultivo celular que carecen de la enzima LRAT, mostraron que LRAT es necesaria para la activación de la cascada STRA6/JAK2/STAT5, así como para la supresión de la señalización de insulina mediante holo-RBP tanto *in vitro* como *in vivo* (Marwarha y col., 2014; Kawaguchi y col., 2015).

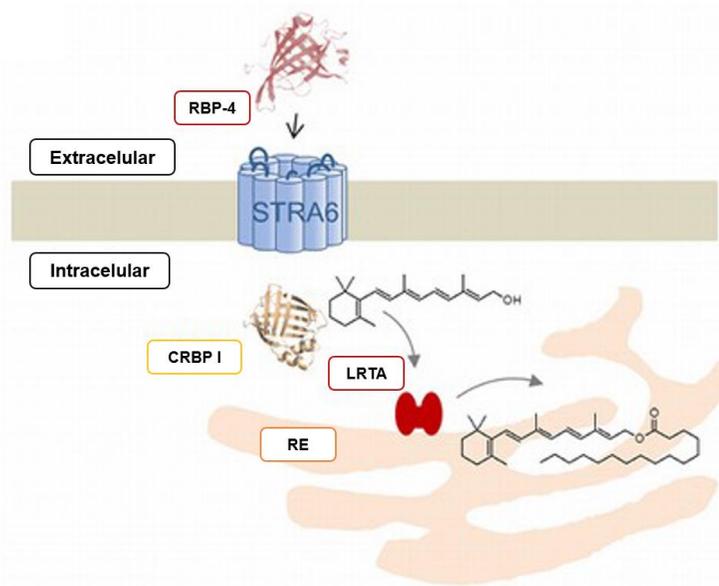


Figura 16. Esquema de la absorción de vitamina A mediada por STRA6 (Modificada de Kelly y von Lintig 2015). Varios estudios han demostrado que STRA6 funciona eficientemente solo cuando se combina con otras proteínas que facilitan el almacenamiento de vitamina A dentro de la célula. La enzima LRTA estimula la actividad de STRA6 y es importante para el transporte de retinol a través de la membrana celular. La proteína CRBP1, una proteína que se une y solubiliza el retinol dentro de la célula, es otra proteína asociada con el almacenamiento de vitamina A que afecta la función de STRA6.

2.6.2 Vitamina D

Se conoce con el nombre de vitamina D a todos los esteroides que poseen la actividad biológica del colecalciferol. Este esteroide proviene del 7-dehidrocolesterol (7-DHC) o también conocido como provitamina D₃ (Bikle, 2014). La vitamina D es un esteroide (esteroides con 27 a 29 átomos de carbono) que se caracteriza por poseer en su estructura básica un anillo ciclopentanoperhidrofenantreno que presenta 3 dobles enlaces conjugados por lo que presenta dos formas principales: colecalciferol, conocida también como vitamina D₃ y ergocalciferol o vitamina D₂, ambas conformaciones son sensibles a la oxidación, cambios conformacionales inducidos por la luz del sol o el calor y sensibles a radicales libres (Figura 17) (Norman, 2008; Holick, 2008).

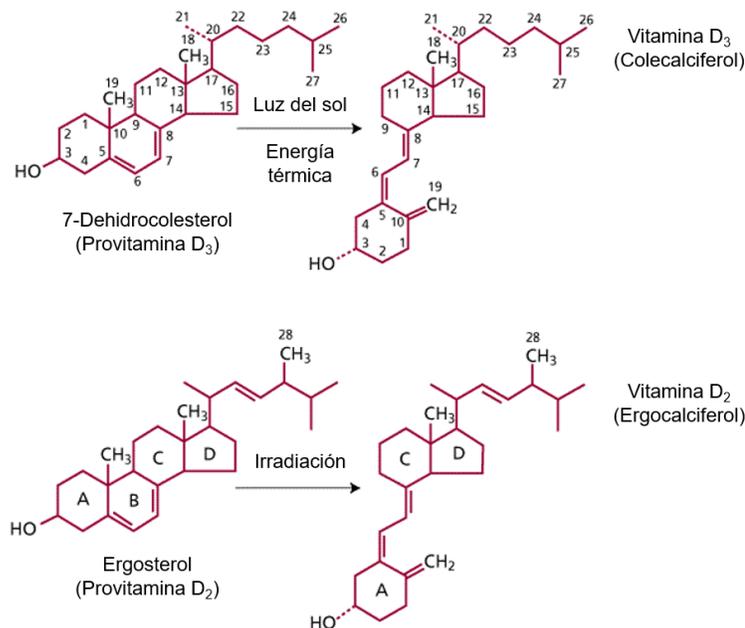


Figura 17. Estructura de la vitamina D₃ y D₂ y sus precursores (Modificada de Endres y Rude, 2005). El colecalfiferol se produce en la piel a partir del 7-DHC con la exposición a la luz solar y el ergocalciferol se produce por irradiación del ergosterol.

La vitamina D₃ se produce a partir del 7-DHC a través de un proceso de dos pasos en el cual el anillo B se rompe con radiación UVB (ultravioleta visible; espectro 280-320 nm) del sol, formando pre-D₃ la cual se isomeriza a D₃ en el hígado (Pike y Mayer, 2010; Bikle, 2014). Al igual que la vitamina D₃, la D₂ se produce por irradiación con UVB, pero a partir del ergosterol en plantas y hongos. La vitamina D₂ difiere de la vitamina D₃ al tener un doble enlace entre el carbono 22 y 23 y un grupo metilo en el carbono 24 en su cadena lateral (Bikle, 2014).

2.6.2.1 Fuentes de vitamina D

En el hombre, la vitamina D se obtiene principalmente de la producción endógena (90%) que proviene de la exposición de la piel a los rayos UVB de la luz solar. Además de la síntesis cutánea, la vitamina D puede obtenerse a partir de la dieta (10%) (Christakos y col., 2010). La mayoría de los alimentos, tanto de

origen animal (colecalfiferol) como de origen vegetal (ergocalciferol), contienen poca vitamina D, a menos que estén fortificados (Valero y col., 2007). Pocos alimentos contienen naturalmente vitamina D, las fuentes dietarias de vitamina D comprenden básicamente el salmón, aceites de pescado, incluido el aceite de hígado de bacalao y alimentos fortificados (Misra y col., 2008; Holick y Chen, 2008). La leche, algunos jugos, panes, yogures y quesos están fortificados con vitamina D (Holick y Chen, 2008). La vitamina D en el pescado se encuentra en forma de vitamina D₃, mientras que la forma utilizada para la fortificación de los alimentos es a menudo D₂ (Bikle, 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de la síntesis endógena y del débil contenido de vitamina D₂ de la dieta, la deficiencia e insuficiencia de vitamina D representan un serio problema de salud pública en numerosas poblaciones de todo el mundo (Rucker y col., 2002; Duró, 2003). Aunque se administren diariamente suplementos de vitamina D₂, no da como resultado un nivel sanguíneo tan alto de 25-hidroxivitamina D₃ en comparación con las cantidades obtenidas de D₃ a partir de la exposición a los rayos UVB (Tripkovic y col., 2012). Este riesgo es mayor en adolescentes, ancianos y en cualquier individuo que no reciba suficiente luz solar (Valero y Hawkins, 2007).

Hasta ahora, es difícil definir la ingesta diaria de vitamina D en los seres humanos, ya que esta vitamina se produce de acuerdo con el consumo de alimentos enriquecidos con D₃ y/o D₂ y por acción de la luz solar. El consumo recomendado según el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (IOM, por sus siglas en inglés) es de 400 UI/día para menores de 1 año, 600 UI/día para individuos de 1 a 70 años y 800 UI/día para mayores de 70 años. Una UI equivale a 0.025 µg de vitamina D₃ (Ross y col., 2011; FAO, 2014).

2.6.2.2 Vitamina D y sus metabolitos

Existen derivados de la vitamina D₃, los más importantes son; el *calcifediol* (25-hidroxicolecalciferol), abreviado como [25-(OH)-D₃] o también 25-

hidroxivitamina D₃); que es el producto de la primera hidroxilación de la vitamina D₃ en el hígado, y el *calcitriol* (1,25-dihidroxicolecalciferol) con abreviación de [1,25-(OH)₂-D₃] o 1,25- dihidroxivitamina D₃, que es el resultado de la segunda hidroxilación consecutiva de la vitamina D₃ (Figura 18), por lo cual, tanto 25-hidroxivitamina D₃ y [25-(OH)-D₃] se utilizarán indistintamente, así como 1,25-dihidroxivitamina D₃ y [1,25-(OH)₂-D₃] (Lorenz y col., 2006). Las hidroxilaciones mencionadas se efectúan de la misma manera para la vitamina D₂ (Endres y Rude, 2005).

La vitamina D, perteneciente a la categoría de las vitaminas liposolubles, además de ser un micronutriente esencial, es considerada una hormona con innumerables acciones en múltiples sistemas fisiológicos, lo cual explica la diversidad de las patologías que se asocian con su deficiencia (Zuluaga y col., 2011). La vitamina D después de ser ingerida o sintetizada en la piel tiene que metabolizarse –vía hígado y riñón- hasta transformarse en su forma activa (1,25-dihidroxivitamina D₃), la cual actúa sobre distintos órganos diana (intestino y hueso principalmente) y diversos procesos fisiológicos como la regulación de la homeostasis mineral, protección del sistema esquelético, modulación del crecimiento y la diferenciación celular en una amplia variedad de tejidos (Woollard y Indyk, 2003; Norman, 2003; Zuluaga y col., 2011).

Recientemente se ha encontrado que la vitamina D tiene funciones en otros órganos adicionales a los ya mencionados, como en el riñón y la hormona paratiroidea (PTH) ya que, al convertirse en su forma activa, actúa por efecto endocrino, autocrino y paracrino (Zuluaga y col., 2011). La 1,25-dihidroxivitamina D₃, se produce mayoritariamente en el riñón y ejerce sus acciones sobre los órganos señalados mediante su unión a receptores (Holick, 2008).

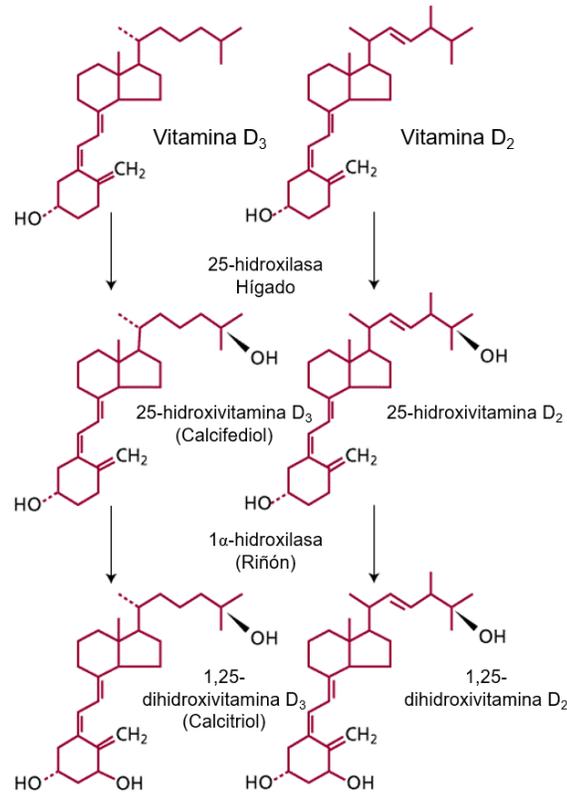


Figura 18. Metabolismo de la vitamina D (Modificada de Endres y Rude, 2005). La vitamina D₂ y D₃ se hidroxilan mediante la acción de la enzima 25-hidroxilasa a 25-hidroxivitamina D en el hígado y posteriormente a 1,25-dihidroxivitamina D en los riñones por la 1α-hidroxilasa. 1,25- dihidroxivitamina D₃ y 1,25-dihidroxivitamina D₂ son las formas biológicamente activas de la vitamina D.

2.6.2.3 Concentraciones séricas de vitamina D

La [25-(OH)-D₃] es la principal forma circulante de vitamina D₃ y por lo tanto es el mejor indicador de los niveles de esta vitamina (Zuluaga y col., 2011). Se ha debatido mucho sobre la definición de deficiencia de vitamina D, mayoritariamente se acepta que una concentración de [25-(OH)-D₃] menor a 50 nmol/L o 20 ng/mL indica deficiencia de vitamina D, mientras que una concentración de [25-(OH)-D₃] de 51-74 nmol/L o de 21-29 ng/mL, se considera que indica insuficiencia; concentraciones mayores a 30 ng/mL se consideran suficientes (Holick y col., 2005; Dawson-Hughes, 2005; Holick, 2007). Se ha supuesto que los niños tienen los mismos requerimientos que los adultos; sin

embargo, no se han llevado a cabo estudios comparables sobre el transporte intestinal de calcio o los niveles de PTH en niños (Holick y Che, 2008). La intoxicación por vitamina D típicamente no ocurre hasta que las concentraciones de [25-(OH)-D₃] son mayores a 375 nmol/L, o 150 ng/mL (Vieth, 1999; Heaney y col., 2003; Holick, 2008).

La deficiencia de vitamina D en niños causa retraso en el crecimiento (Huldschinsky y col., 1919; Hess y Unger, 1921; Hess, 1936), así como los signos y síntomas clásicos del raquitismo (Huldschinsky y col., 1919; Hess, 1936; Holick, 2006). En los adultos, la deficiencia de vitamina D precipitará y exacerbará la osteopenia y la osteoporosis y aumentará el riesgo de fractura (Chapuy y col., 1996; Bakhtiyarova y col., 2006; Larsen y col., 2004; Chen y col., 2007).

Estudios epidemiológicos y clínicos sugieren que los niveles bajos de vitamina D podrían contribuir a la epidemia actual de enfermedades crónicas entre las que se incluyen; diabetes tipo 1 y 2, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hipertensión arterial, obesidad entre otras (DeLuca, 2004; Holick, 2007; Norman, 2008).

2.6.2.4 Causas de la deficiencia de la vitamina D

Como ya se mencionó, la principal fuente de vitamina D para los humanos es la exposición a la luz solar (Brot y col., 2001; Holick, 2006; Holick, 2007). Cualquier cosa que interfiera con la penetración de la radiación UVB en la piel afectará la síntesis cutánea de vitamina D₃ (Holick, 2003; Chen y col., 2007). La melanina es extremadamente eficiente en la absorción de radiación UVB y, por lo tanto, el aumento de la pigmentación de la piel reduce notablemente la síntesis de vitamina D₃ (Clemens y col., 1982). De manera similar, un protector solar con una protección solar de 15 absorbe el 99% de la radiación UVB incidente y, por lo tanto, cuando se aplica tópicamente de forma adecuada reducirá la síntesis de vitamina D₃ en la piel en un 99% (Matsuoka y col., 1987). Los afroamericanos con piel muy oscura tienen un factor de protección solar (SPF) de 15 y, por lo

tanto, su capacidad para producir vitamina D en su piel se reduce hasta en un 99% (Clemens y col., 1982; Chen y col., 2007). Esto, junto con la disminución de la ingesta de leche son las explicaciones de por qué la mayoría de los afroamericanos que viven en un clima templado son deficientes en vitamina D, mientras que los africanos que viven cerca del ecuador donde la síntesis de vitamina D₃ es más eficiente debido a la mayor incidencia de luz UVB (Thacher y col., 2006). Esto sugiere que más del 30-50% de los niños y adultos corren el riesgo de deficiencia de vitamina D (Gordon y col., 2004; Sullivan y col., 2005; Marwaha y col., 2005; Sato y col., 2005).

Por otro lado, el envejecimiento se asocia con una disminución de las concentraciones de 7-DHC. Un hombre de 70 años tiene el 25% de 7-DHC que tiene un adulto joven y, por lo tanto, tiene una capacidad reducida del 75% para producir vitamina D₃ en la piel (Holick y col., 1989). Debido a que la vitamina D es soluble en grasa, es absorbida fácilmente por los adipocitos. La obesidad está asociada con la deficiencia de vitamina D, y se cree que se debe a la retención de vitamina D por parte de la grasa corporal (Wortsman y col., 2000).

En el 2006 se subestimó la prevalencia de la insuficiencia y deficiencia de la vitamina D, reportando una deficiencia de 30-50% en niños y adultos en Estados Unidos, Canadá y México, según datos tomados del NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey). En adultos hay una prevalencia global de 41.6% de deficiencia de vitamina D, con mayor proporción y riesgo en personas de raza negra e hispanas (NHANES, 2006; ENSANUT, 2006).

2.6.2.5 Mecanismos de acción de la vitamina D

Para ejercer sus efectos fisiológicos, tanto la vitamina D aportada por la alimentación y la sintetizada en la piel, debe convertirse a su forma activa (Zuluaga y col., 2011). Para ello inicialmente es transportada por una proteína específica; proteína de unión a la vitamina D (VDBP, por sus siglas en inglés), que es una proteína fijadora específica para vitamina D y sus metabolitos. De

esta manera, la vitamina D viaja por la circulación sanguínea hasta el hígado, donde sufrirá la primera hidroxilación (Zitterman, 2003; Bouillon y col., 2008). Como se mencionó anteriormente, la vitamina D se metaboliza en el hígado a [25-(OH)-D₃] y luego este metabolito es transportado por la VDBP hasta los riñones y convertirse en [1,25-(OH)₂-D₃] (DeLuca, 2004; Holick y Garabedian, 2006). Desde el punto de vista biológico, la vitamina D es intrínsecamente inactiva y requiere de las hidroxilaciones sucesivas en el hígado y riñón para formar [1,25-(OH)₂-D₃] (Zuluaga y col., 2011).

Se reconoce que muchos otros tejidos en el cuerpo, incluyendo macrófagos, cerebro, colon, próstata, mama y otros, tienen la maquinaria enzimática para producir [1,25-(OH)₂-D₃] (Mawer y col., 1994; Schwartz y col., 1998; Cross y col., 2001; Bikle, 2005). La [1,25-(OH)₂-D₃] producida por los riñones entra en la circulación y viaja a sus principales tejidos diana; el intestino y el hueso, donde interactúa con su receptor de vitamina D (VDR) para mejorar la absorción intestinal de calcio (Holick y Garabedian, 2006). La presencia de este receptor, así como la maquinaria enzimática requerida, han sido identificados en un gran número de células y tejidos humanos, tales como el sistema nervioso central, el sistema inmune, el tejido adiposo, el sistema cardiovascular, el páncreas, la próstata, entre otros (INSP, 2011).

La función clásica de la [1,25-(OH)₂-D₃] es la regulación de la homeostasis del calcio (DeLuca, 2004). Sin embargo, el receptor VDR se expresa en tejidos que no están implicados en el metabolismo del calcio. Esto indica que la [1,25-(OH)₂-D₃] está implicada en la regulación de muchas funciones no calémicas (Nagpal y col., 2005).

2.6.2.6 Regulación del metabolismo de la vitamina D

Para sus múltiples efectos, la [1,25-(OH)₂-D₃] requiere una estricta regulación de activación y desactivación a través de cambios en la expresión de las enzimas hidroxilasas con el fin de aumentar o disminuir las concentraciones

de [1,25-(OH)₂-D₃], según el estado fisiológico (Plum y DeLuca, 2009). Por ejemplo, los niveles bajos de calcio inducen un aumento de la actividad de la 1 α -hidroxilasa; esto explica porque la hipocalcemia es detectada por el receptor sensible al calcio (CaSR) de las células paratiroides, con lo que se aumenta la expresión de PTH, y ésta a su vez, induce la transcripción de la enzima 1 α -hidroxilasa en las células tubulares proximales del riñón, y por ende se incrementa la producción de [1,25-(OH)₂-D₃] (Christakos y col., 2010). Para regular este ciclo, la misma [1,25-(OH)₂-D₃] suprime la producción de PTH por regulación de su transcripción, y regula negativamente también a la 1 α -hidroxilasa (Dusso y col., 2005). Además de la PTH, otras hormonas que ejercen regulación endocrina sobre la actividad de la 1 α -hidroxilasa son los estrógenos, la calcitonina, la prolactina, la hormona de crecimiento y la insulina (Zuluaga y col., 2011). Su efecto estimula la acción de esta enzima y favorece la producción de [1,25-(OH)₂-D₃] (Norman, 2008). Ésta a su vez, interactuará con los receptores VDR de la [1,25-(OH)₂-D₃], con lo que generará dos principales efectos; 1) promover la absorción intestinal de calcio y fósforo; y 2) liberar calcio y fosfato de la matriz mineral ósea (St-Arnaud, 2008).

2.6.2.7 Almacenamiento, transporte y eliminación de la vitamina D

A diferencia de las demás vitaminas liposolubles, la vitamina D no se almacena a nivel del hígado salvo en los pescados magros (Zuluaga, 2011). Los principales lugares de almacenamiento son: el tejido adiposo (bajo la forma de vitamina D₃) y los músculos (bajo la forma de [25-(OH)-D₃]) (Le Grusse y Watier, 1993; Rojas, 1998). La vitamina D₃ y sus metabolitos son moléculas lipofílicas y por su baja solubilidad en el medio acuoso del plasma necesitan ser transportadas por la VDBP, concretamente a la VDBP (85%) y a la albúmina (15%) (Quesada, 2004). La proteína VDBP circula en concentraciones 20 veces superior a la de los metabolitos de la vitamina D (Dusso, 2005). En condiciones fisiológicas el 99% de los metabolitos de la vitamina D circulantes, viajan unidos

a proteínas, principalmente VDBP; albúmina y lipoproteínas en menor grado, lo que evita la intoxicación por dicha vitamina (Rapado, 2000).

En relación con el transporte de la [1,25-(OH)₂-D₃], hay que destacar que circula en plasma, el 87% lo hace unido a la VDBP, alrededor del 13% lo hace unido a la albúmina y sólo un 0.4% aproximadamente, circula libre (Fuentes et al., 2003). La principal forma circulante en el organismo es la [25-(OH)-D₃] ligada a la VDBP (5-30 ng/mL). Los otros metabolitos se presentan en concentraciones mucho más bajas (Le Grusse y Watier, 1993). Los niveles séricos de la [25-(OH)-D₃] varían según la época del año, teniendo niveles máximos al final del verano y niveles mínimos al final del invierno, poniendo de manifiesto la relación entre la exposición solar y la síntesis endógena (Abbas, 2016). Aunque la luz solar incrementa la concentración sérica de [25-(OH)-D₃] no influye sobre la tasa de [1,25-(OH)₂-D₃], lo que sugiere la existencia de una regulación muy específica de la hidroxilación renal (Le Grusse y Watier, 1993).

Tanto la vitamina D como la mayoría de sus metabolitos son eliminados vía fecal, existiendo vías de degradación, como la formación de derivados trihidroxilados. La [1,25-(OH)₂-D₃] tiene una vida media en plasma de 4-5 horas (Moya, 2000; Borrajo, 2001).

2.6.2.8 El tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina D

Retomando lo ya citado, el tejido adiposo es un órgano metabólico importante, tiene un papel esencial en el equilibrio energético y la homeostasis de la glucosa y es el principal sitio de almacenamiento de vitamina D (Rosenstreich y col., 1971). También expresa VDR y las enzimas involucradas en el metabolismo de la vitamina D (Li y col., 2008; Ching y col., 2011). Investigaciones recientes han demostrado que la vitamina D₃ es activa en los adipocitos, interactúa con receptores de membrana, moléculas adaptadoras, fosfatasa y proteínas

correguladoras nucleares. Por lo tanto, participa en el control de la expresión génica, así como la señalización celular (Ryynänen y col., 2014).

Estudios demostraron que usando vitamina D₃ radiomarcada administrada por vía oral a ratas destetadas deficientes en vitamina D, aparece una cantidad significativa de radiactividad en el tejido adiposo dentro de las primeras 24 h de su administración. Después de 6 semanas de vitamina D₃, el 80% de toda la radioactividad estaba presente en el tejido adiposo, en donde el 50% de la radioactividad total en el tejido adiposo se debió a la presencia de vitamina D₃ no metabolizada y la otra mitad a metabolitos polares y ésteres de vitamina D. Cuando se detuvo el tratamiento con vitamina D, el tejido adiposo liberó la vitamina D muy lentamente. La cantidad liberada de vitamina D fue proporcional a la concentración de vitamina D ya presente en el tejido adiposo. Esto indica que el tejido adiposo tiene las características de un depósito para el almacenamiento y la liberación de vitamina D. Este depósito acumula vitamina D proporcional a su concentración en plasma y lo libera a un ritmo mucho más lento que es proporcional a su concentración en grasa (Rosenstreich y col., 1971).

En los seres humanos, aproximadamente el 17% de la dosis de vitamina D administrada por vía oral se almacena en el tejido adiposo y el resto se consume o se metaboliza (Heaney y col., 2011). La distribución de la vitamina D y sus metabolitos en los tejidos humanos se estudió utilizando colecalciferol radiactivo y mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para medir la concentración de vitamina D en el tejido adiposo (Mawer y col., 1972).

El tejido adiposo y los músculos voluntarios fueron los principales sitios de almacenamiento de vitamina D (Abas y col., 2016). Se ha sugerido que el tejido adiposo funciona como un sistema de amortiguación de la vitamina D que evita la síntesis descontrolada de [25-(OH)-D₃] en el hígado (Brouwer y col., 1998). La liberación lenta de vitamina D del tejido adiposo en ayunas puede limitar la posible toxicidad de cantidades excesivas de la vitamina (Mawer y col., 1972). La concentración promedio de vitamina D en SAT fue casi similar a la obtenida en

muestras de tejido adiposo perirrenal y pericárdico, pero menor que en el tejido adiposo axilar (Abas, 2016).

Mediante espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS, por sus siglas en inglés) se midió la vitamina D y sus metabolitos en diferentes compartimientos corporales y localización subcelular del tejido adiposo. La vitamina D se encontró principalmente en las gotas de lípidos de los adipocitos (Malmberg y col., 2014).

2.6.2.9 Producción de [1,25-(OH)₂-D₃] por el tejido adiposo

Como se explicó anteriormente, la vitamina D₃ es una hormona que debe ser activada por enzimas en el hígado y los riñones (Endres y Rude, 2005). Se deben agregar dos grupos hidroxilo para formar la hormona activa [1,25-(OH)₂-D₃] (Abas, 2016). La primera hidroxilación ocurre en el hígado por la acción de la 25-hidroxilasa para producir [25-(OH)-D₃]. La segunda hidroxilación requiere la enzima 1 α -hidroxilasa presente en el riñón y convierte el [25-(OH)-D₃] en [1,25-(OH)₂-D₃] (Human Physiology, 2011). La expresión y actividad de la enzima 1 α -hidroxilasa renal (codificada por el gen CYP27B1) está estrechamente regulada por el calcio sérico, fósforo, calcitonina, PTH y la [1,25-(OH)₂-D₃] (Li y col., 2008).

En humanos, cuatro enzimas del citocromo P450; CYP2R1, CYP3A4, CYP27A1 y CYP2J2 poseen actividad 25-hidroxilasa, siendo el CYP2R1 el más específico (Abas, 2016). Tres de estas enzimas; CYP2R1, CYP2J2 y CYP27A1 se encontraron expresadas en SAT y VAT (Wamberg y col., 2013).

Se reportó que en cultivo de preadipocitos 3T3-L1, se expresó la 1 α -hidroxilasa (Li y col., 2008). De acuerdo con lo reportado por Li y col., en el tejido adiposo la 1 α -hidroxilasa no está regulada por el calcio.

2.6.2.10 Expresión de VDR en el tejido adiposo

Se reportó la expresión del gen VDR en adipocitos 3T3-L1, preadipocitos humanos y células de adipocitos diferenciados en cultivo (Kamei y col., 1993; Trayhurn y col., 2011). Además de su expresión en SAT y VAT de humanos (Ding y col., 2012).

2.6.2.11 Acción genómica de la [1,25-(OH)₂-D₃]

La [1,25-(OH)₂-D₃] es más hidrofílica y tiene menor afinidad por la VDBP que la [25-(OH)-D₃], lo que facilita que en su forma libre alcance los órganos diana, donde la [1,25-(OH)₂-D₃] ejerce sus efectos mediante dos mecanismos: regulando la transcripción genética y mediante un receptor de membrana nuclear de la vitamina D (nVDR, por sus siglas en inglés). (Quesada y Luque, 2000).

El VDR nuclear es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que regulan la expresión génica (Abas, 2016). Alrededor del 3% de los genes en el genoma humano están regulados por [1,25-(OH)₂-D₃] (Bouillon y col., 2008). El ligando del receptor VDR atrae a uno de los receptores de retinoides RXR, el receptor nuclear para el ácido 9-*cis*-retinoico, en un heterodímero que reconoce elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) en genes diana (Abas, 2016). Después de la dimerización con RXR, se reclutan complejos comoduladores. El efecto es la inducción o represión de genes diana (Hausler y col., 2011; Pike y Meyer, 2014).

El VDR humano se compone de 427 aminoácidos (Hausler y col., 2011). Tiene tres dominios: el primer dominio es el DBD, el cual tiene dos dedos de zinc que se unen a los surcos del ADN en sitios discretos como los VDRE (Abas, 2016). El segundo dominio es el LBD y el tercer dominio es una región flexible que se une a los dominios DBD y LBD (Bikle, 2014).

La estructura del LBD de VDR es una estructura tipo sándwich de al menos 12 α hélices. Contiene una zona de dimerización (para la heterodimerización con RXR) y un dominio AF-2 (Rochel y col., 2000). La hélice terminal (hélice H12) en

LBD actúa como una puerta que se cierra alrededor del ligando, forma una interfaz para los coactivadores y facilita la interacción de VDR con RXR (Bikle y col., 2014).

Los genes diana VDR se caracterizan por tener los dedos de zinc en DBD combinados de los receptores VDR y RXR (Abas, 2016). La unión de [1,25-(OH)₂-D₃] a VDR estimula la unión entre VDR y RXR. El heterodímero VDR-RXR reconoce a VDRE en genes regulados por vitamina D. Tras la unión de [1,25-(OH)₂-D₃], el nVDR se fosforila y su conformación se modifica liberando correpresores (Hausler y col., 2011). Además, la unión de [1,25-(OH)₂-D₃] a VDR induce un cambio conformacional de la hélice en AF-2 que permite el reclutamiento de coactivadores (Freedman, 1999). Los complejos corre reguladores reclutados tras la unión de VDR a su VDRE incluyen una subunidad que se une directamente al VDR generalmente a través de un motivo LXXLL junto con varias subunidades que contienen actividad enzimática tales como histonas acetil transferasas o deacetilasas, metiltransferasas y desmetilasas entre otros complejos. Estos complejos corre reguladores son genéticos y específicos de cada célula (Bikle, 2014).

2.6.2.12 La vitamina D juega un papel fundamental en la modulación de la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo

Retomando información acerca del tejido adiposo, este órgano está constituido por células inmunes, las cuales desempeñan un papel muy importante en la homeostasis inmunitaria (Lorente-Cebrián y col., 2012). Varios estudios in vitro han demostrado que la [1,25-(OH)₂-D₃] ejerce una acción antiinflamatoria sobre los adipocitos (Abbas, 2016). Se reportó que la vitamina D₃ disminuyó la liberación de quimiocinas y citoquinas secretadas por los adipocitos y la quimiotaxis de los monocitos (Marcotorchino y col., 2012; Lorente-Cebrián y col., 2012; Ding y col., 2013; Gao y col., 2013). En explantes de tejido adiposo, la [25-(OH)-D₃] y [1,25-(OH)₂-D₃] redujeron la liberación de citocinas del tejido adiposo omental, pero no del SAT. Sorprendentemente, este efecto se produjo solo en

mujeres, pero no en explantes masculinos (Roy y col., 2015). *In vivo*, la vitamina D disminuyó citocinas proinflamatorias, así como en ratones obesos inducidos por dieta (Karkeni y col., 2015).

2.6.2.13 Vitamina D y obesidad

Un gran número de estudios confirmó la presencia de deficiencia de vitamina D en personas obesas (Abas, 2016). Se han sugerido diferentes explicaciones para la insuficiencia de vitamina D asociada a la obesidad, incluyendo: 1) *Dilución volumétrica*; lo que significa que los niveles séricos de vitamina D disminuyen a medida que aumenta el tamaño corporal y, por lo tanto, las reservas de grasa (Drincic y col., 2012). 2) *Diferencias en el estilo de vida entre personas obesas y delgadas*; las personas obesas pueden ser sensibles a su forma corporal, participar en menos actividades al aire libre, encubrirse y usar más ropa que las personas más delgadas y esto minimiza su exposición al sol. 3) *Diferencias en la capacidad de activar la vitamina D entre individuos obesos y delgados*; el nivel de expresión de las enzimas activadoras de la vitamina D; 25-hidroxilasa, CYP2J2 y la 1 α -hidroxilasa CYP27B1, fue menor en SAT en personas obesas en comparación con mujeres delgadas (Wamberg y col., 2013). 4) *Secuestro de vitamina D en el tejido adiposo*; el secuestro significa que la vitamina D sintetizada por vía oral y por esta vía se une fuertemente en depósitos de grasa y por lo tanto no se libera de forma apropiada en la circulación para soportar concentraciones séricas de [25-(OH)-D₃]. El término secuestro fue sugerido originalmente por Wortsman y col. en el 2000, quienes informaron que los sujetos obesos tenían una respuesta más débil a una dosis estándar de radiación UVB que las personas de peso normal. Cabe señalar que los mecanismos que controlan la deposición y liberación de vitamina D del tejido adiposo aún se desconocen (Wortsman y col., 2000; Malmberg y col., 2014).

2.6.2.14 ¿La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo independiente para la obesidad?

En situaciones en donde existe una variación estacional por las bajas temperaturas y altas latitudes, la vitamina D actúa como un mecanismo de señalización para ayudar a los animales a almacenar más grasa para la termogénesis (Foss, 2009). Si esto se aplica a los humanos, entonces el cuerpo almacenará más grasa cuando disminuyan los niveles de vitamina D (Abbas, 2016). Se ha propuesto que la deficiencia de vitamina D es responsable de la obesidad (Foss, 2009). A pesar del importante papel que juega la vitamina D en el metabolismo energético, los estudios realizados hasta ahora en cuanto a la vitamina D y su implicación en la obesidad en humanos no son concluyentes (Vanlint, 2013; Cherniack y col., 2014). Teóricamente, la baja cantidad de vitamina D puede causar obesidad a través de los siguientes mecanismos: 1) *Hiperparatiroidismo secundario*; que resulta del estado de hipovitaminosis D. El nivel elevado de PTH aumenta el calcio intracelular en los adipocitos, esto conduce a una mayor lipogénesis y aumento de peso (McCarty y Thomas, 2003; Grethen y col., 2011). 2) *Regulación del crecimiento y remodelación del tejido adiposo humano mediante la modulación de la adipogénesis y la apoptosis*; dosis bajas de [1,25-(OH)₂-D₃] inhibieron la apoptosis en células 3T3-L1 diferenciadas (Sun y Zemel, 2004).

A pesar de la sugerencia de que la deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo independiente para la obesidad, los hallazgos de algunos investigadores refutan esta afirmación (Abbas, 2016). Estudios genéticos, han encontrado que la obesidad es un factor causal para el desarrollo de la deficiencia de vitamina D, pero no hay evidencia de que la deficiencia de vitamina D actúe como un factor causal para el desarrollo de la obesidad (Vimaleswaran y col., 2013).

2.6.3 Vitamina E

La vitamina E es un nutriente liposoluble que se consume a través de la dieta, y que en el cuerpo humano actúa como antioxidante, ya que protege a los lípidos de los efectos potencialmente dañinos de los radicales libres, especialmente del ataque por ciertas especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y formar radicales hidroxilo y radicales peroxilo (Rimbach y col., 2010; Cárdena y Ghosh, 2013). La vitamina E no solo ha sido reconocida porque inhibe la peroxidación lipídica (degradación oxidativa de lípidos) principalmente, sino porque también ejerce un papel general como antioxidante en sitios de unión a proteínas y ácidos nucleicos (Azzi y col., 2004; Blé y col., 2010).

2.6.3.1 Isoformas de la vitamina E

En realidad, el término de vitamina E no se refiere a una estructura química en particular, sino que agrupa distintas formas, describiéndose así una familia de moléculas anfipáticas esenciales en la dieta humana (Cárdenas y Ghosh, 2013). Esta vitamina se encuentra presente en 8 formas diferentes, las cuales pertenecen a dos grupos; los tocoferoles y los tocotrienoles (El Hadi y col., 2018). Cada uno de estos grupos, está formado por cuatro homólogos; α , β , γ , δ -tocoferoles y α , β , γ , δ -tocotrienoles (Gee, 2011). Los tocoferoles y tocotrienoles contienen un anillo denominado cromano, el cual se compone de un anillo fenólico unido a un anillo heterocíclico y una cadena alifática larga (Gee, 2011; Cárdenas y Ghosh, 2013). La presencia de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) en el anillo cromano definen que estas sustancias sean α , β , γ o δ , por ejemplo, el α -tocoferol contiene tres grupos metilo (Figura 19) (Maija, 2011). Estas diferencias estructurales determinan la actividad biológica de cada molécula, siendo los homólogos α los biológicamente activos (Rimbach y col., 2010). Debido a que el α -tocoferol es la molécula con mayor actividad biológica, con frecuencia suele referirse a la vitamina E como α -tocoferol (Cárdenas y Ghosh, 2013; El Hadi y col., 2018).

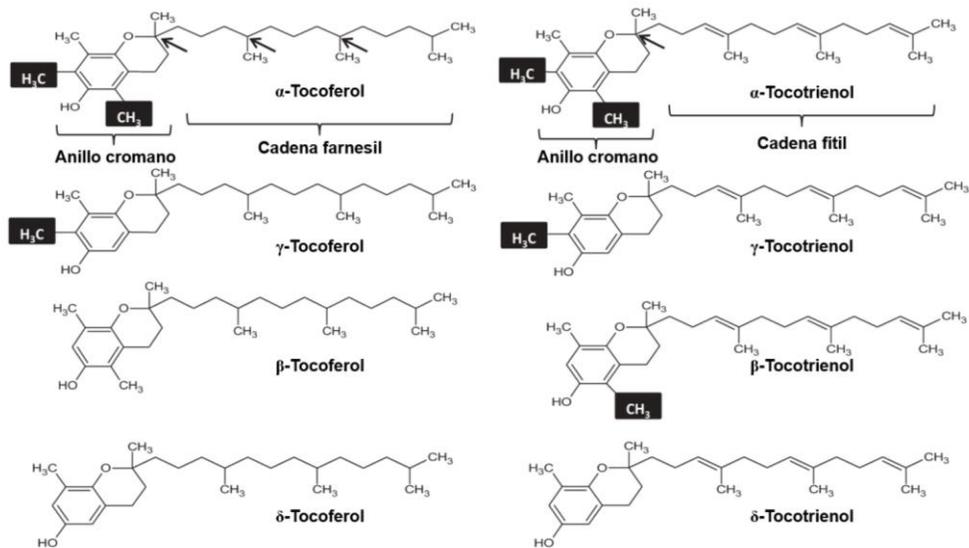


Figura 19. Estructura básica de los tocoferoles y tocotrienoles (Cárdenas y Ghosh, 2013). Los tocoferoles y tocotrienoles son derivados del 6-cromanol con una cadena lateral alifática farnesil, en el caso de los tocoferoles y una cadena fitil en el caso de los tocotrienoles. Los cuatro homólogos del tocoferol tienen una cadena lateral de 16 carbonos completamente saturada, mientras que los homólogos de los tocotrienoles tienen una cadena similar que contiene tres dobles enlaces. Los grupos metilo dentro del anillo cromano, determinan el estado α , β , γ , o δ . Las flechas apuntan a centros quirales existentes ubicados en la cadena farnesil y la cadena fitil de los tocoferoles y tocotrienoles respectivamente.

Si bien hay 3 centros quirales dentro de la cadena insaturada de los tocoferoles en las posiciones 2, 4 y 8, los tocotrienoles con una cola insaturada poseen solo un centro quiral en la posición 2 (Cárdenas y Ghosh, 2013). Cada carbono quiral puede tener dos orientaciones de los grupos metilo, y estas orientaciones se designan como; R (dextrógiro) y S (levógiro) dependiendo de si rotan la luz polarizada hacia la derecha o hacia la izquierda, respectivamente (El Hadi, 2018). Debido a que hay 3 carbonos quirales en los tocoferoles y cada uno posee una de dos orientaciones, existen 8 combinaciones posibles (estereoisómeros); RRR, RRS, RSR, SRR, SSS, RSS, SRS y RSS (Figura 20) (Cárdenas y Ghosh, 2013). Durante la síntesis química de la vitamina E se producen cantidades equimolares de estos estereoisómeros (El Hadi y col., 2018). Actualmente, las formas sintéticas de vitamina E provienen del α -tocoferol,

que consisten principalmente en una mezcla racémica de ocho estereoisómeros denominada “all-rac- α -tocoferol”, a diferencia de la estereoisofoma RRR- α -tocoferol que es de origen natural (Jensen y Lauridsen, 2007). Así que sólo las plantas pueden producir el estereoisómero RRR, por ello la estereoisofoma de la vitamina E “RRR- α -tocoferol” se designa como la molécula con una actividad biológica del 100% (Cárdenas y Ghosh, 2013; El Hadi y col., 2018). Estudios tanto en humanos como en animales, sugieren que la potencia biológica de la vitamina E de origen natural es 1.36 veces mayor en comparación con su contraparte producida por síntesis química (Lodge, 2005). Además de que otros estudios indican que la forma RRR- α -tocoferol se incorpora preferentemente en las lipoproteínas y se mantiene en el plasma, mientras que todas las demás estereoisofomas se eliminan rápidamente por excreción y formación de metabolitos (Traber y Kayden, 1989; Kayden y Traber, 1993; Mustacich y col., 1998).

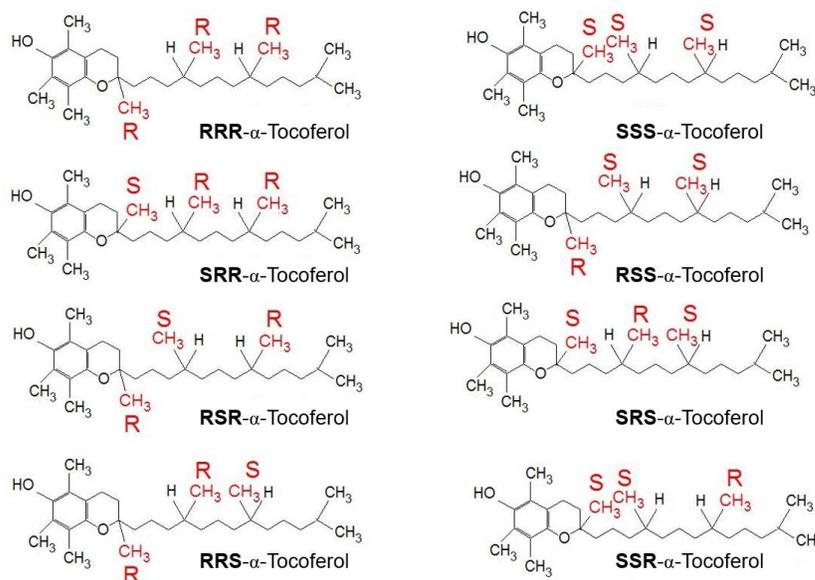


Figura 20. Estereoisómeros del α -tocoferol (Adaptada de Maija, 2011). Cada isómero del grupo de los tocoferoles posee 8 estereoisómeros, debido a que todas las formas presentan la misma cadena insaturada fitil, y solo se diferencian por la orientación de sus carbonos quirales (R o S), como es el caso del isómero α -tocoferol.

Por otro lado, la proteína hepática transportadora de tocoferol (α -TTP) sólo tiene afinidad por los estereoisómeros R del α -tocoferol. Otros isómeros, aunque son eficientemente absorbidos, no se difunden al plasma ni a los tejidos y, en consecuencia, carecen de actividad efectiva de vitamina E, por esta razón, el grupo de trabajo denominado Comité Permanente para Evaluación Científica de las Referencias de Consumo Dietético, organizado por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos en colaboración con organismos de Canadá, consideró exclusivamente como vitamina E a la forma natural contenida en los alimentos como “RRR- α -tocoferol” y sus estereoisómeros RRS-, RSR-, y RSS- (Traber y Sies, 1996; Food and Nutrition Board e Institute of Medicine, 2002). El RRR- α -tocoferol no solo tiene la mayor actividad biológica antioxidante, si no que es la forma más abundante en el plasma humano, aproximadamente 25 $\mu\text{mol/L}$, mientras que el γ -tocoferol alcanza solamente el 10% de este valor (Cárdenas y Ghosh, 2013; El Hadi y col., 2018).

2.6.3.2 Efecto antioxidante de la vitamina E

Los beneficios para la salud del consumo de vitamina E a través de la dieta o la suplementación se cree que son por sus propiedades antioxidantes (Cárdenas y Ghosh, 2013). Se ha demostrado que la vitamina E es ampliamente aceptada como uno de los antioxidantes más potentes en la naturaleza, ya que protege a las células contra daño celular causado por los radicales libres que atacan las membranas celulares a través de la peroxidación lipídica (Green y col., 2008; Schneider, 2009; Cai y col., 2012; Peh y col., 2016). El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación de especies reactivas y la defensa antioxidante, y conduce al daño del ADN y alteraciones en la biología celular (Birben y col., 2012). La propiedad antioxidante de la vitamina E se atribuye al grupo hidroxilo del anillo aromático de los tocoferoles, que dona hidrógeno para neutralizar a los radicales libres o a las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Peh y col., 2016). Se sabe que los ROS juegan varios papeles importantes en una serie de procesos biológicos y regulan

la fisiología y la función de las células. Los ROS son una clase química heterogénea que incluye radicales, como el ion superóxido (O_2^\bullet), el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el óxido nítrico (NO^\bullet), y los no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) y peroxinitrito (NO_3^-) (Cárdenas y Ghosh, 2013; Peh y col., 2016).

En la peroxidación lipídica, los radicales hidroxilo y peroxilo creados por el estrés oxidativo y liberados principalmente por las mitocondrias, atacan a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's por sus siglas en inglés) que conforman las membranas celulares (Thomas y col., 2009; Niki, 2009; Colquhoun, 2010; Freinbichler y col., 2011). Estos radicales a su vez pueden propagar la formación de radicales lipídicos (Figura 21) que eventualmente alteran la membrana celular, produciendo proteínas y bases nitrogenadas de ADN modificadas, eventos que se han asociado con el desarrollo de enfermedades como cáncer (Poli y col., 2008; Niki, 2009; Matsuda y col., 2013).

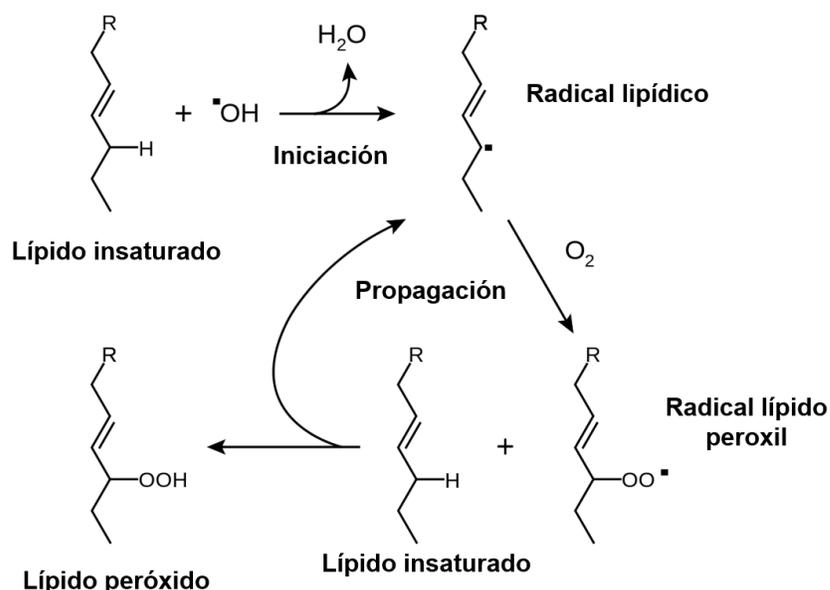


Figura 21. Mecanismo de la peroxidación lipídica (Modificada de Vickers, 2007). La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares.

Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. En la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno (-CH₂-) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. La iniciación es el paso en donde el radical del ácido graso es producido. Los iniciadores en células vivas más notables son especies reactivas del oxígeno, tales como •OH, el cual se combina con un hidrógeno para dar lugar a agua y a un radical de ácido graso. Este radical no es una molécula muy estable, de modo que reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O₂), creando de este modo un radical ácido graso peroxil. Este radical también es una especie muy inestable por lo cual reacciona con otro ácido graso, dando lugar a otro radical ácido graso diferente. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera.

La propiedad antioxidante de la vitamina E se ejerce a través de los grupos hidroxilo del anillo cromano que donan fácilmente su hidrógeno al radical peroxilo, dando como resultado la formación de una especie de lípidos estable (Fujisawa y Kadoma, 2005). Al donar el átomo de hidrógeno, la vitamina E se convierte en un radical libre relativamente no reactivo a medida que el electrón desapareado se deslocaliza alrededor del anillo aromático (Figura 22) (Stocker y col., 2003). La eficacia de esta protección depende de dos factores: en primer lugar, la movilidad de la molécula en las membranas que está determinada por la cadena alifática; y en segundo lugar, el número de grupos metilo en el anillo cromano, cada grupo metilo confiere capacidad antioxidante adicional. Se piensa que además, la proximidad del grupo metilo al grupo hidroxilo es un factor importante. Por lo tanto, los homólogos α , que tienen el mayor número de grupos metilo, y que están cerca del grupo hidroxilo, son más eficaces que los otros homólogos (Rimbach y col., 2010). De acuerdo con Müller y col., se ha observado un orden de eficacia antioxidante de los tocoferoles de la siguiente manera; α -tocoferol > β -tocoferol > γ -tocoferol > δ -tocoferol (Müller y col., 2010).

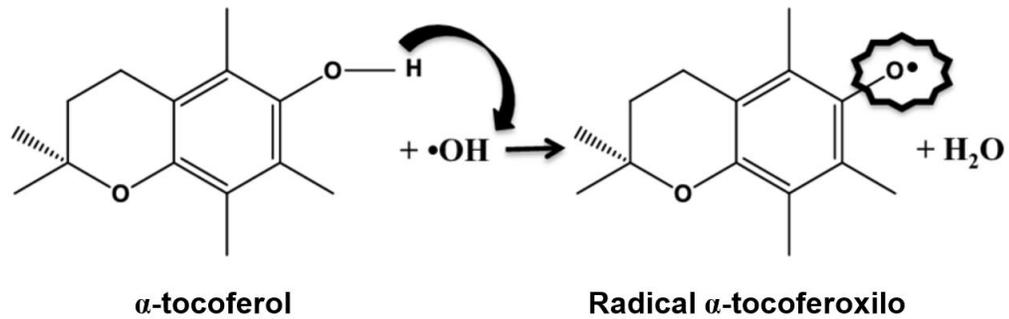


Figura 22. Reacción antioxidante del alfa tocoferol (Modificada de Vara y Pula, 2014).

Esta figura representa la estructura y el mecanismo de acción química del α -tocoferol como desintoxicador de radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$). En este mecanismo los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical lipídico originando. El α -tocoferol es probablemente el más importante inhibidor de la reacción en cadena producida durante la peroxidación de lípidos en animales.

En general, se ha considerado que los tocotrienoles exhiben una mayor actividad antioxidante en comparación con los tocoferoles en modelos *in vivo* e *in vitro*, aunque la capacidad antioxidante de las diferentes isoformas α sigue siendo tema de discusión (Suzuki y col., 1993). El debate parece provenir de ensayos experimentales en las que se han evaluado a las diversas isoformas (Suzuki y col., 1993; Yoshida y col., 2003; Müller y col., 2010). Los múltiples isómeros y estereoisómeros, tanto naturales como sintéticos existentes dentro de la familia de la vitamina E, siguen siendo objeto de estudio, pues hasta ahora se tiene poca claridad en la información y resultados contradictorios sobre el uso y los efectos de estas moléculas, por lo que la mayoría de los autores sugieren que se deberían de hacer más estudios para dar una idea más detallada de las propiedades específicas de dichas moléculas. Por lo que no se debe esperar que todas las isoformas sean iguales, como sugieren algunos estudios. Dependiendo de la isoforma estudiada, existen efectos opuestos entre las diversas formas de la vitamina E (Müller y col., 2010; McCary y col., 2012; Torricelli y col., 2012; Cárdenas y Ghosh, 2013; El Hadi, 2018).

Sin embargo, por sus propiedades antioxidantes, la vitamina E ha sido empleada como suplemento en diferentes enfermedades, por ejemplo; en pacientes con fibrosis quística, la suplementación con vitamina E mejoró la absorción de los lípidos (Ramsey y col., 1992). En pacientes hemodializados con enfermedad cardiovascular, redujo la incidencia de infartos (Boaz y col., 2000). En mujeres embarazadas, el tratamiento con vitaminas E disminuyó el índice de preeclampsia y mejoró la función endotelial (Chappell y col., 1999). En pacientes diabéticos se ha informado un mejor control glucémico (Ceriello y col., 1991; Paolisso y col., 1993). En otros estudios clínicos se ha observado reducción en la incidencia de cáncer después del consumo de vitamina E (Blot y col., 1993). Durante los últimos años se ha encontrado que además de poseer efectos antioxidantes, la vitamina E tiene efectos antiaterogénicos que no se debe a la capacidad antioxidante de dicha vitamina, actuando sobre la señalización celular y la regulación de la expresión de genes (Rimbach y col., 2010).

2.6.3.3 Ingesta, déficit y exceso de vitamina E

La vitamina E se encuentra principalmente en el reino vegetal, las fuentes naturales de esta sustancia son los aceites vegetales, frutos secos, hortalizas de hojas verdes y ciertos cereales (NHANES, 2000). La cantidad de vitamina E que se necesita depende de la edad e incluye la vitamina E que se obtiene a partir de los alimentos que se consumen y de los suplementos que se toman. De acuerdo con la RDA de α -tocoferol, en los adultos el consumo tanto en hombres como en mujeres es de 15 mg/día, en niños menores de 14 años el consumo diario debe ser de 6-11 mg/día y en mujeres lactantes es de 19 mg/día. 1 mg de α -tocoferol es equivalente a 1.49 UI de forma natural o 2.22 UI de forma sintética (NIH,2016).

Las dosis de consumo máximo tolerables que se pueden tomar con seguridad para tratar las deficiencias de vitamina E son; 200-600 mg/día para niños menores de 14 años y de 600-1000 mg/día para adultos (NIH, 2016). Se ha reportado que se puede consumir hasta una cantidad de 200-600 mg/día sin causar trastorno alguno en un estado en donde no hay deficiencia, ya que la

mayor parte de la vitamina E en el cuerpo se almacena en el tejido adiposo (NHANES, 2000; NIH, 2016). Parte del peligro potencial del consumo de altas dosis de vitamina E podría atribuirse a su efecto de desplazar otros antioxidantes solubles en las grasas y romper el balance natural del sistema antioxidante (Huang y Appel, 2003; Zhang y col., 2011).

Una deficiencia grave de vitamina E provoca principalmente síntomas neurológicos, inclusive equilibrio y coordinación deficiente (ataxia), daños en los nervios sensoriales (neuropatía periférica), debilidad muscular (miopatía) y daños en la retina del ojo (retinopatía pigmentaria). El sistema nervioso en desarrollo parece ser especialmente vulnerable a la deficiencia de esta vitamina: los niños que sufren una deficiencia de vitamina E desde su nacimiento y no son tratados rápidamente, desarrollan síntomas neurológicos (Traber, 2006). Por el contrario, nunca se ha registrado una deficiencia de vitamina E sintomática en adultos sanos que consumen dietas pobres en vitamina E (Traber, 2006).

Sin embargo, las pequeñas diferencias estructurales entre las isoformas de la vitamina E tienen un impacto significativo en el metabolismo de esta vitamina (Cárdenas y Ghosh, 2013). Por lo tanto, los hábitos dietéticos juegan un papel importante en cuanto a las isoformas de la vitamina E que se consumen; por ejemplo, una dieta mediterránea consiste en vegetales de hoja verde, nueces y aceite de oliva que contienen altas cantidades de α -tocoferol, mientras que una dieta occidental es alta en aceite de soja que contiene una mayor proporción de γ -tocoferol (Helzlsouer y col., 2000; Trichopoulou y col., 2003). Es importante tener en cuenta que, para un valor nutricional, existe una preferencia por la isoforma α -tocoferol (Acuff y col., 1994; Burton y col., 1998; Jiang y col., 2001).

2.6.3.4 Metabolismo de la vitamina E

La absorción de vitamina E es similar a la absorción de grasa a través del intestino delgado (Cárdenas y Ghosh, 2013). La vitamina E se absorbe junto con los lípidos de los alimentos en la parte proximal del intestino, las secreciones de

ácidos biliares en la luz intestinal ayudan a formar micelas que contienen a la vitamina E y productos de hidrólisis lipídica que se absorben a través de la membrana de las células intestinales y se transportan como quilomicrones en la linfa y la sangre (Kayden y Traber, 1993; Traber, 2007). Todas las formas de vitamina E se absorben igualmente, lo cual sugiere ausencia de selectividad a este nivel (Blé y col., 2008). Después de pasar a través de la vía linfática, los quilomicrones alcanzan la circulación sistémica y se hidrolizan progresivamente bajo la acción de la lipoproteinlipasa endotelial secretada por el páncreas, liberando principalmente restos de quilomicrones, ácidos grasos libres y HDL que también contienen vitamina E. De esta forma la vitamina puede ser transportada de manera inespecífica dentro de las lipoproteínas hacia los tejidos diana y el hígado (Kayden y Traber, 1993; Traber, 2007). Durante este proceso, una parte de la vitamina E se libera en el plasma (Blé y col., 2008). En el hígado, el α -tocoferol es captado desde los quilomicrones principalmente por las LDL, además de ser transportado de forma selectiva mediante la proteína α -TTP que selecciona de manera efectiva al α -tocoferol sobre las diversas isoformas de vitamina E. Por lo que los isómeros del tocoferol y los isómeros sintéticos que no son reconocidos por la α -TTP, son degradados y excretados a través de la orina o la bilis (Traber y Kayden, 1989; Hosomi y col., 1997; Traber, 2007). Parte del tocoferol transportado en las HDL es captado una vez más por los hepatocitos, reconocido específicamente por la α -TTP reciclado y liberado por segunda ocasión en las VLDL (Goti y col., 1998).

La afinidad relativa de unión de los tocoferoles con la α -TTP es la siguiente; α -tocoferol 100%, β -tocoferol 38%, γ -tocoferol 9% y δ -tocoferol 2% (Hosomi y col., 1997). En la sangre, el α -tocoferol es rápidamente transferido entre las diferentes lipoproteínas (Fechner y col., 1998). Se considera que la α -TTP del hígado es el factor más importante para mantener las concentraciones adecuadas de α -tocoferol en el plasma (Blé y col., 2008).

2.6.3.5 Vitamina E y obesidad

La obesidad en niños y adultos está asociada con niveles bajos de antioxidantes solubles en grasa en suero (Moor y col., 1992; Ohrvall y col., 1993). Además, Decsi y col., en un estudio reportaron que los niveles de α -tocoferol en plasma eran de 50-60% más bajos en niños obesos que en niños de peso normal. En los seres humanos, el α -tocoferol es particularmente importante para la protección contra la oxidación de las LDL (Esterbauer y col., 1989; Carpentert y col., 1997). Niveles bajos de α -tocoferol puede conducir a un aumento de la oxidación de LDL en niños obesos. La evidencia indica que la oxidación de LDL es extremadamente importante para la absorción de LDL por los macrófagos y, por lo tanto, el desarrollo posterior de lesiones ateroscleróticas (Witztum y Steinberg, 1991). Por lo que la administración de suplementos de α -tocoferol tiene como resultado una disminución en la oxidación de LDL (Mosca y col., 1997). Algunos estudios han demostrado que el suministro de vitamina E en modelos animales regulan la adipogénesis y grasa corporal a través de la modulación directa del receptor PPAR γ (Ribot y col., 2004).

2.6.3.6 Efectos no antioxidantes: actividad reguladora de genes de la vitamina E

Desde su descubrimiento, la vitamina E ha sido estudiada principalmente por sus efectos antioxidantes y recientemente por su capacidad de señalización celular (Rimbach, 2010). Estudios han demostrado que los tocoferoles son moléculas capaces de inducir señales a nivel celular al interactuar con receptores celulares y factores de transcripción impulsando así la expresión de ciertos genes, modulan los niveles de algunas proteínas y cambian los niveles de actividad enzimática tanto en células cultivadas como *in vivo* (Figura 23). (Azzi y col., 2004).

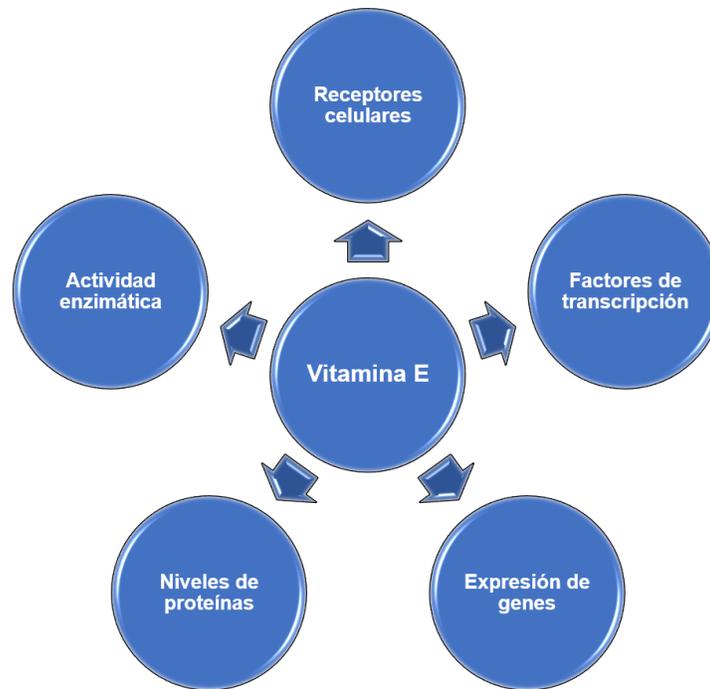


Figura 23. La vitamina E como mediador de señalización celular (Modificada de Rimbach y col., 2010). La actividad biológica de las diferentes formas de la vitamina E están involucradas en diversos procesos, actuando como moléculas que modulan la señalización celular que afectan a los receptores celulares, factores de transcripción, expresión génica, niveles de proteína y actividades enzimáticas de moléculas diana específicas.

En las últimas dos décadas, se ha demostrado que la vitamina E tiene efectos directos e indirectos en varias enzimas involucradas en la transducción de señales, como la proteína quinasa C (PKC), proteína fosfatasa 2A (PP2A), proteína tirosina fosfatasa (PTP), proteína tirosina quinasa (PTK), diacilglicerol quinasa (DAGK), fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa-2 (COX-2) entre otras (Rimbach y col., 2002; Zingg y Azzi, 2004).

Otra evidencia de una función no antioxidante del α -tocoferol está relacionada con su papel en la regulación de la expresión de genes específicos no solo asociados al estrés oxidativo, sino también en la homeostasis del colesterol, las vías inflamatorias y el tráfico celular (El Hadi, 2018). Estos genes incluyen aquellos que codifican proteínas implicadas en la inflamación y la adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1, IL-1b, IL-2, IL-4) y factor de crecimiento

transformante (TGF), regulación del ciclo celular (ciclina D1, ciclina E1 y p27), receptores de control transcripcional (PPAR γ), receptores (CD36, receptor para LDL) y metabolismo (Citocromo P450 (CYP)) (Rimbach y col., 2010; Ahsan y col., 2014).

El α -tocoferol tiene un efecto inhibidor sobre la producción de moléculas de adhesión y la adhesión de monocitos a las células endoteliales; un evento principal en el proceso de inflamación, posiblemente a través de un efecto regulatorio directo en la expresión de ICAM-1. Este mismo efecto lo puede conseguir a través de la regulación inducida por IL-1 de las ICAM-1 y las VCAM-1 (Yoshikawa y col., 1998). Otra molécula de gran importancia en el proceso de inflamación es la interleucina IL-1 β , la cual se encuentra disminuida por la acción del α -tocoferol. Los niveles de mRNA muestran que el efecto inhibidor se ejerce a nivel de la expresión génica de IL-1 β (Akeson y col., 1991). El receptor PPAR γ está regulado positivamente por el α -tocoferol y aún más por el γ -tocoferol. Este comportamiento puede ser relevante no solo para la prevención del cáncer, sino también para el tratamiento de los trastornos inflamatorios, cardiovasculares y obesidad (Campbell y col., 2003).

2.7 Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso mediante el cual las células multipotenciales se diferencian en adipocitos maduros (Figura 24). Una célula madre mesenquimal primero se convierte en un preadipocito y luego en un adipocito maduro a través del proceso de diferenciación terminal. El preadipocito sufre alteraciones morfológicas y bioquímicas hasta convertirse en un adipocito funcional (Abbas, 2006). Estas células cumplen un importante papel metabólico y endocrino y ocurre por la activación de un programa coordinado de expresión génica mediado por factores de transcripción, el cual conduce a cambios en la actividad y/o en la cantidad de proteínas implicadas en la fisiología del adipocito como, por ejemplo, proteínas implicadas en la homeostasis de lípidos y la glucosa (Rosen y MacDougald, 2006). Los adipocitos maduros pueden realizar muchas

funciones, incluida la síntesis de lípidos, el tráfico de ácidos grasos a través de la membrana, responder a la señalización de la insulina y la secreción de adipocinas (Wood, 2008). Diveros estudios indican la participación de muchos factores en el proceso de diferenciación de los adipocitos (Rosen y Macdougald, 2006).

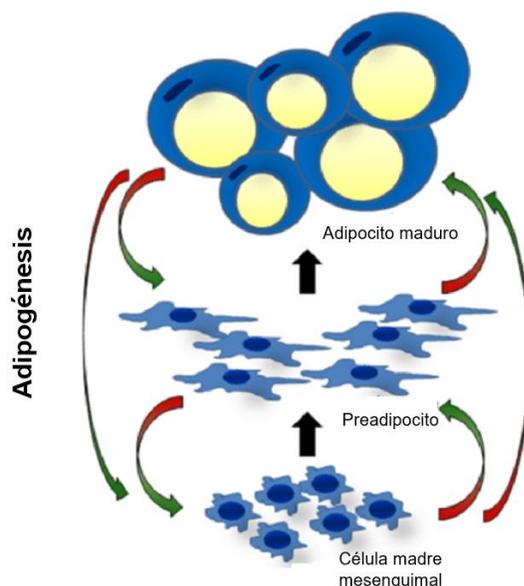


Figura 24. Diagrama de adipogénesis (Modificada de Dodson y col., 2015). La adipogénesis es la proliferación, diferenciación y maduración de las células del linaje adiposo para formar células capaces de asimilar lípidos. Las células dentro de los depósitos adiposos son capaces de liberar sustancias químicas que pueden regular la fisiología del cuerpo.

2.7.1 Receptores C/EBP

Los receptores CCAAT enhancer-binding-protein (C/EBP) son factores de transcripción expresados principalmente en tejidos hepáticos, grasos e intestinales (Birkenmeier y col., 1989). La expresión de estos factores de transcripción está restringida a células diferenciadas terminalmente, y se tiene evidencia que indica que dichos factores pueden estimular la transcripción de varios genes que marcan el estado diferenciado del preadipocito (Christy y col., 1989; Friedman y col., 1989; Kaestner y col., 1990; Park y col., 1990). Estas observaciones llevaron a la especulación de que los receptores C/EBP puede

jugar un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento del estado de diferenciación celular terminal (Cao y col., 1991).

Se han identificado hasta ahora seis isoformas de estos factores de transcripción; α , β , γ , δ , ε y ζ , los cuales contienen un dominio en su región C-terminal altamente conservado con una estructura de cremallera de leucinas (Tang y col., 2004). Además, se ha demostrado que estas isoformas presentan dimerización altamente homóloga y se unen al ADN con una especificidad similar (Cao y col., 1991; Scott y col., 1992; Tang y col., 2004).

Algunos de estos factores de transcripción participan en la regulación de la adipogénesis como, por ejemplo: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ y C/EBP δ (Ramji y Foka., 2002). Su expresión es inducida un poco después del comienzo del programa de diferenciación celular y disminuye en la fase de diferenciación terminal. Se desconoce si esta inducción de los factores de transcripción es una causa de la entrada de estas proteínas a un ciclo celular o es una consecuencia de la misma (Ntambi y Kim, 2000; Viveros, 2002). Dos de estos factores participan en las etapas tempranas de la diferenciación celular como son C/EBP β y C/EBP δ , que son expresados en los preadipocitos y desaparecen con el arresto del crecimiento celular y se ha descrito, son los responsables de activar a C/EBP α (Cowherd y col., 1999). C/EBP α se manifiesta durante la fase terminal de la diferenciación, inmediatamente antes de la expresión de otros genes específicos de los adipocitos (Gregoire y col., 1998).

Cuando C/EBP α es activado, a su vez activa la expresión de PPAR γ e interviene en la diferenciación terminal del adipocito. C/EBP α y PPAR γ pueden activar recíprocamente la expresión uno del otro y actúan sinérgicamente para promover la diferenciación del adipocito, así como también actúan en forma cooperativa en la transactivación de diversos genes (Figura 25) (Tang y col., 2004).

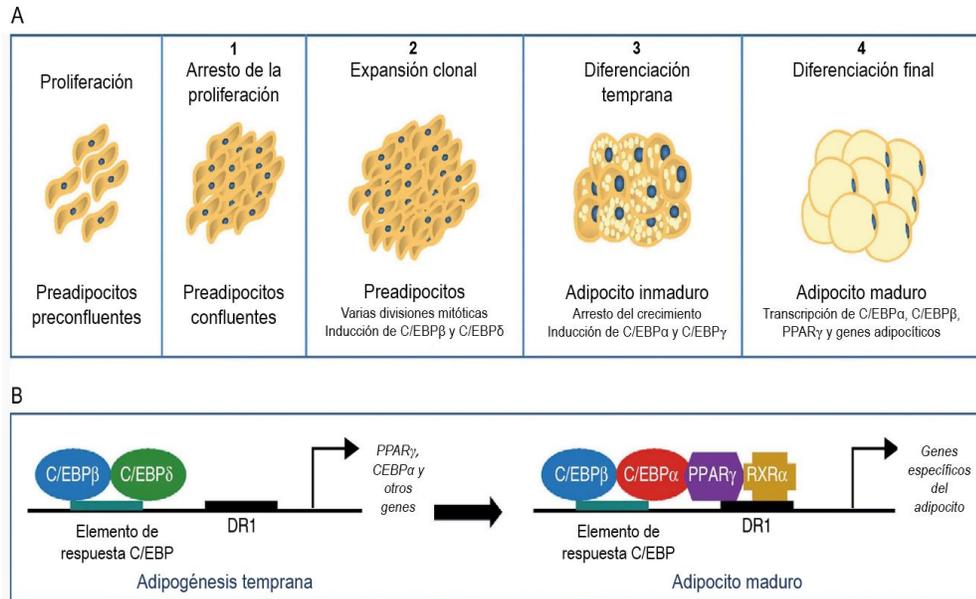


Figura 25. Etapas de la diferenciación de los adipocitos (Adaptada de Rosen y MacDougald, 2006). A) Se reportan 4 estadios principales en el proceso de transformación de preadipocito a adipocito maduro; (1) la detención de la proliferación por contacto, lo que indica que la confluencia se ha alcanzado, (2) la expansión clonal regulada por diversos factores de transcripción y hormonas, (3) en la diferenciación temprana se detiene la división celular y el adipocito comienza a acumular lípidos y por último (4) durante la diferenciación terminal, se alcanza la morfología del adipocito maduro. B) En la adipogénesis temprana, los factores C/EBPβ y C/EBPδ se expresan durante la expansión clonal e inducen la expresión de otros factores como C/EBPα y PPARγ que están implicados en la regulación de otros genes para culminar con la diferenciación del adipocito y que este adipocito maduro lleve a cabo la acumulación de lípidos.

PPAR γ , además de ser un receptor nuclear el cual tiene la capacidad de unirse directamente al ADN para regular la expresión génica, es considerado el "regulador maestro" de la adipogénesis (Rosen y MacDougald, 2006). La expresión forzada de PPAR γ es suficiente para inducir la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos (Tontonoz y col., 1994) y no se ha descubierto ningún factor que promueva la adipogénesis en ausencia de PPAR γ (Rosen y Macdougald, 2006). Estos hallazgos son consistentes con la observación de que la mayoría de los factores pro-adipogénicos parecen funcionar al menos en parte

mediante la activación de la expresión o actividad de PPAR γ (Rosen y Macdougald, 2006).

Numerosos estudios indican que se requiere la activación del ligando de PPAR γ (generalmente AMPc) para inducir la adipogénesis, pero no para mantener la expresión génica dependiente de PPAR γ en adipocitos maduros (Rosen y Macdougald, 2006). Otros estudios han encontrado que los factores de transcripción C/EBP β pueden aumentar la producción de ligandos de PPAR γ , pero estos hallazgos no condujeron a la identificación de un agonista de PPAR γ endógeno definitivo (Kim y col., 1998; Hamm y col., 2001).

2.8 Línea celular 3T3-L1

Las células 3T3-L1 provienen de células de embrión de ratón suizo, a partir de fibroblastos que se aíslan de la fracción del estroma vascular del tejido adiposo y pueden diferenciarse en adipocitos maduros (Green y Kehinde 1974; Viveros, 2002). Estas células son morfológicamente similares a las células fibroblásticas preadipocíticas del estroma del tejido adiposo humano; tras la estimulación hormonal apropiada, las células 3T3-L1 terminan el crecimiento mitótico y adquieren propiedades y características morfológicas y enzimáticas de los adipocitos (Green y Kehinde 1975; Russell y Ho 1976; Rubin y col., 1977; Student y col., 1980). Además, las células 3T3-L1 expresan muchos de los mismos genes que los adipocitos humanos, los cuales codifican para muchas de las adipocinas ya anteriormente mencionadas tales como; TNF α , RBP-4, leptina, angiotensina, adiponectina, resistina, IL-6 entre otras (Gregoire y col., 1998; Cowherd y col., 1999; Ntambi y Kim, 2000).

La conversión in vitro de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos ha proporcionado un sistema útil para estudiar el papel de los factores de transcripción C/EBP en la diferenciación celular (Cao y col., 1991). Diversos estudios han indicado que los receptores C/EBP participan en la diferenciación terminal de las células 3T3-L1. Se tiene evidencia de que la expresión temporal de C/EBP se correlaciona con el progreso de la diferenciación de los adipocitos (Cao y col., 1991; Ntambi y

Kim, 2000). C/EBP es indetectable en los fibroblastos en proliferación, pero se acumula a un nivel sustancial en adipocitos diferenciados (Birkenmeier y col., 1989). Además, la expresión prematura de C/EBP impide la proliferación celular y acentúa la diferenciación en presencia de hormonas adipogénicas (Umek y col., 1991). Por otro lado, C/EBP es capaz de trans-activar genes que codifican varias proteínas específicas del tejido adiposo como; PPAR γ , esteroil coenzima A (CoA) y el transportador de glucosa sensible a la insulina (Christy y col. 1989; Kaestner y col., 1990). A pesar de estas observaciones, la expresión prematura de C/EBP α no es suficiente para convertir a los fibroblastos en adipocitos (Umek y col., 1991). Esta observación indica que la adipogénesis probablemente requiera la función de proteínas reguladoras no caracterizadas además de C/EBP (Cao y col., 1991).

PPAR γ no solo es crucial para la adipogénesis, sino también para el mantenimiento del estado diferenciado (Rosen y Macdougald, 2007). La introducción adenoviral de PPAR γ en adipocitos 3T3-L1 maduros causa desdiferenciación con pérdida de acumulación de lípidos y disminución de la expresión de marcadores de adipocitos (Tamori y col., 2002).

La transición y conversión de células precursoras de adipocitos a adipocitos maduros ocurre en una serie de etapas (Avram y col., 2007). Antes de la diferenciación, los preadipocitos experimentan tasas de proliferación exponenciales, durante cuyo tiempo aparecen morfológicamente similares a los fibroblastos preadipocíticos humanos. Entre la proliferación y la diferenciación, las células se vuelven esféricas y acumulan lípidos (Fajas, 2003). Se ha reportado que la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros tarda un periodo aproximado entre 10 y 14 días con la administración de inductores adipogénicos, también conocido como “cóctel adipogénico” (Figura 26) (Cowherd y col., 1999; Ntambi y Kim, 2000).

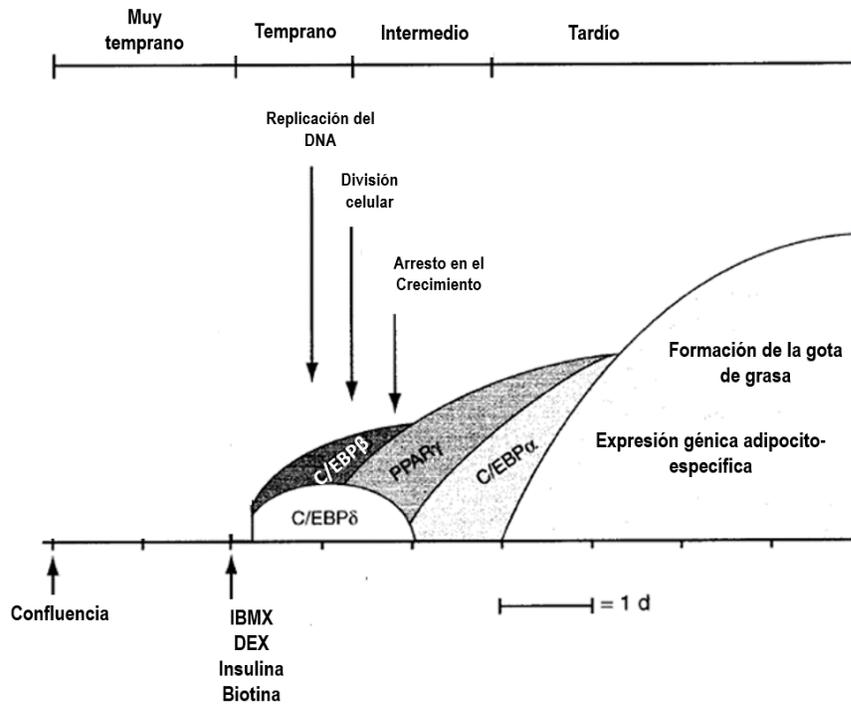


Figura 26. Etapas de la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 (Adaptada de Ntambi y Kim, 2000). Las principales etapas de diferenciación de los preadipocitos se presentan cronológicamente por días, indicadas por una línea corta y marcadas por los diferentes estadios identificados en el proceso de diferenciación; muy temprano, temprano, intermedio y tardío. También se muestra la etapa en la que se adiciona el cóctel adipogénico. Las áreas marcadas con color representan períodos de expresión de ciertos genes como; PPAR γ y C/EBP α , β , y δ durante la diferenciación. Aproximadamente 48 h después de la inducción con el cóctel adipogénico, los preadipocitos que se diferencian, experimentan una mitosis posconfluente y un posterior arresto del crecimiento. Estas células se someten al menos a una ronda de replicación de ADN y división celular. Al completar la mitosis posconfluente, entran en un paro de crecimiento, por lo que estas células se comprometen a convertirse en adipocitos maduros.

2.8.1 Inductores adipogénicos

Muchos sistemas de cultivo requieren la adición de señales proliferativas y pro-adipogénicas para la inducción de la diferenciación celular después del arresto del crecimiento en la confluencia (Gregoire y col., 1998). Los protocolos de inducción para la diferenciación varían y dependen del sistema de cultivo celular específico utilizado (Avram y col., 2007). El cóctel adipogénico

comúnmente usado para la inducción de células 3T3-L1 incluye; un medio de cultivo basal; DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), dexametasona (DEX), isobutilmetilxantina (IBMX) y concentraciones suprafisiológicas de insulina (Gregoire y col., 1998; Cowherd y col., 1999; Ntambi y Kim, 2000).

Las células 3T3-L1 se diferencian espontáneamente en células grasas cuando se mantienen en suero fetal bovino (SFB) durante un período de varias semanas (Green y Kehinde 1976). Sin embargo, la exposición de estas células a DEX y IBMX 48 horas después de la confluencia, desencadena la entrada sincrónica de células en el programa de diferenciación, aumentando así el número de preadipocitos reclutados y acelerando todo el proceso de diferenciación de 5 a 7 días (Green y Kehinde 1974; Green y Kehinde 1975; Green y Kehinde 1976; Rubin y col., 1978).

Aproximadamente 24 horas después de la inducción por el cóctel adipogénico, los preadipocitos detenidos por crecimiento ingresan sincrónicamente al ciclo celular y se someten al menos a una ronda de replicación de ADN (mitosis posconfluente) y duplicación celular (expansión clonal), procesos que conducen a la amplificación clonal de células comprometidas (Pairault y Green, 1979; Bernlohr y col., 1985; Cornelius y col., 1994; MacDougald y Lane, 1995). Es durante esta mitosis y expansión clonal posconfluente que el ADN de la célula se desenrolla para permitir el acceso de los factores de transcripción a los elementos de respuesta presentes en los genes importantes para la adipogénesis (Bernlohr y col., 1985; Cornelius y col., 1994).

Dos días después de la inducción, las células 3T3-L1 experimentan un segundo y último período de detención del crecimiento llamado “detención del crecimiento celular”, un paso que también se requiere para la diferenciación terminal y precede a la misma (Scott y col., 1982). Los receptores PPAR γ y C/EBP α , cuyos niveles permanecen bajos en los preadipocitos, pero comienzan a aumentar justo antes y durante esta etapa, parecen jugar un papel cooperativo en la mediación del segundo arresto de crecimiento que anuncia el compromiso con la diferenciación (Umek y col., 1991; Altiook y col., 1997). Después de la

detención del crecimiento celular, los preadipocitos clonales, ahora completamente comprometidos, comienzan a expresar marcadores tardíos de diferenciación de adipocitos para el día 3 (Gregoire y col., 1998; Ntambi y Kim, 2000). Las células se vuelven esféricas, acumulan gotas de grasa y completan la diferenciación terminal entre los días 5 y 7 (Avram y col., 2007).

2.8.2 Rol de los inductores adipogénicos

Glucocorticoides; se ha establecido *in vitro* que los glucocorticoides, o bien, el análogo sintético DEX, aumenta la diferenciación en presencia de insulina o SFB en todas las líneas celulares primarias de preadipocitos (Rubin y col., 1978; Gaillard y col., 1991). La DEX se usa ampliamente para la conversión adipogénica máxima de preadipocitos en cultivo, dependiendo del modelo celular que se utilice, es el requerimiento del tratamiento con glucocorticoides para su diferenciación o para acelerar el proceso de diferenciación (Avram y col., 2007).

Los glucocorticoides producen cambios rápidos y transitorios en la transcripción de genes adipogénicos durante las primeras etapas de diferenciación después de la inducción hormonal (MacDougald y col., 1994). En particular, se ha demostrado que la DEX induce la expresión del factor de transcripción C/EBP δ en células 3T3-L1, que, a su vez, desencadena vías para la diferenciación impulsada por C/EBP α (MacDougald y col., 1994; Yeh y col., 1995; Wu y col., 1996; Shin y col., 2003).

Insulina; los estudios *in vitro* respaldan el efecto adipogénico de la insulina. Es una hormona obligada para la diferenciación primaria de los preadipocitos (Gregoire y col., 1992; Suryawan y col., 1997). En la mayoría de los casos, los preadipocitos primarios derivados de animales en estado embrionario requieren concentraciones bajas de insulina (1-10 nM) en presencia de SFB o altas concentraciones de insulina (1-10 μ M) en un medio de cultivo sin suero (Deslex y col., 1987; Gregoire y col., 1990; Suryawan y col., 1997; Gregoire y col., 1998). En preadipocitos primarios que experimentan bajos niveles de diferenciación

espontánea, la adición de insulina conduce a un aumento en la fracción de células que experimentan conversión adipogénica (Gregoire y col., 1992; Suryawan y col., 1997). En contraste, la adición de insulina a altas dosis a líneas celulares clonales no afecta el número de células, sino que, mejora la tasa de acumulación de lípidos en las células que ya se diferenciaron (Rubin y col., 1978).

Antes de la expresión de los receptores de insulina durante etapas posteriores de la diferenciación, la insulina media su efecto adipogénico temprano a través de receptores de factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-I), que se expresan en preadipocitos (Smith y col., 1998). Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que la exposición a la insulina estimula la expresión de PPAR γ en preadipocitos humanos, lo que sugiere un posible mecanismo para la acción de la insulina *in vivo* (Rieusset y col., 1999).

IBMX; Al igual que la DEX e IBMX, se usa de forma rutinaria para la diferenciación de líneas celulares de preadipocitos clonales y primarios (Rubin y col., 1978). Se ha demostrado que la IBMX acelera la diferenciación de líneas celulares de preadipocitos primarios (Rubin y col., 1978; Yang y col., 1989; Yarwood y col., 1995), así como desencadena la expresión de C/EBP β y PPAR γ (Cao y col., 1991; Hansen y col., 2001). Además, la MIX aumenta la producción y concentración intracelular de AMPc a través de los siguientes mecanismos; mediante la inhibición de la fosfodiesterasa y el bloqueo de la proteína G reguladora de AMPc (Parsons y col., 1988).

III. JUSTIFICACIÓN

México presenta un problema de salud pública derivado del sobrepeso y la obesidad. A nivel mundial nuestro país ocupa el primer lugar de obesidad en adultos y segundo en niños (OMS, 2012). Las dietas con un alto contenido energético y un bajo perfil de antioxidantes y vitaminas ocasionan un aumento de grasa corporal. Se ha observado un aumento en la concentración sérica de la proteína RBP-4 durante el sobrepeso y obesidad que se correlaciona con el desarrollo de complicaciones como inflamación, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, dislipidemia y esteatosis hepática (Zabetian-Targhi y col., 2015). RBP-4 induce la expresión de PPAR γ , factor clave en la diferenciación de los adipocitos y acumulación de lípidos en los mismos (Carvajal y col., 2007; Sandoval y col., 2009). Disminuir los niveles de RBP-4 podría ayudar a disminuir la hiperplasia e hipertrofia en el tejido adiposo. Se ha observado experimentalmente que las vitaminas A, D y E afectan las concentraciones de adipocinas, por lo cual se evaluará el efecto de la administración de las vitaminas A, E y D sobre la expresión del gen de la proteína RBP-4 en adipocitos 3T3-L1 (Mercader y col., 2008; Landrier y col., 2009; Lira y col., 2011).

IV. HIPÓTESIS

Las vitaminas A, D y E reducen la expresión del gen de la proteína RBP-4 en adipocitos 3T3-L1.

V. OBJETIVOS

a. General

Evaluar el efecto de las vitaminas A, D y E sobre la expresión del gen de la proteína RBP-4 en adipocitos 3T3-L1.

b. Particulares

- Evaluar el efecto dosis respuesta de las vitaminas A, D y E sobre la expresión del mRNA y proteína de RBP-4 en adipocitos 3T3-L1.
- Evaluar el curso temporal del efecto de las vitaminas A, D y E en la expresión de mRNA y proteína de RBP-4 en los adipocitos 3T3-L1.

VI. Metodología

6.1 Diferenciación de células 3T3-L1

Para la diferenciación de las células 3T3-L1, se mantuvieron a los fibroblastos preadipocíticos en cajas Petri (100 x 15 mm) con un medio basal, el cuál contiene; DMEM al 90%, SFB al 10% y antibióticos (Estreptomocina/Penicilina) al 1%, e incubar bajo las siguientes condiciones; una temperatura de 37 °C, una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂ durante 3 a 4 días. Bajo estas condiciones, se formó una monocapa de células con una confluencia del 70 al 80%. A partir de esta monocapa, se realizaron subcultivos en cajas multiwell de 12 pozos, mediante una digestión enzimática con tripsina. Para ello, se hizo un lavado con 3 mL de tripsina, después se adicionaron nuevamente 5 mL de tripsina y se incubó durante 5-7 minutos. Transcurrido ese tiempo, se tomaron las células digeridas y se centrifugaron durante 4-5 minutos para después retirar el sobrenadante y finalmente sembrar las células por 48 horas, para formar nuevamente una monocapa de células al 70-80% de confluencia y repetir el mismo procedimiento hasta tener la cantidad deseada de células al 100% de confluencia (ATCC, 2016).

Una vez que los preadipocitos han alcanzado el 100% de confluencia, al medio basal se le añadieron los inductores adipogénicos; 1.0 µM de DEX, 0.5 mM de IBMX, 1.0 µg/mL de insulina y 1.0 Mm de biotina y se incubaron durante 48 horas. Después de este tiempo, se reemplazó el medio basal con medio de mantenimiento constituido por DMEM 90%, SFB 10% y 1.0 µg/mL de insulina (Figura 27) (Kuri-Harcuch y col., 1978; Un Suk, 2013; ATCC, 2016).

Diferenciación de células 3T3-L1

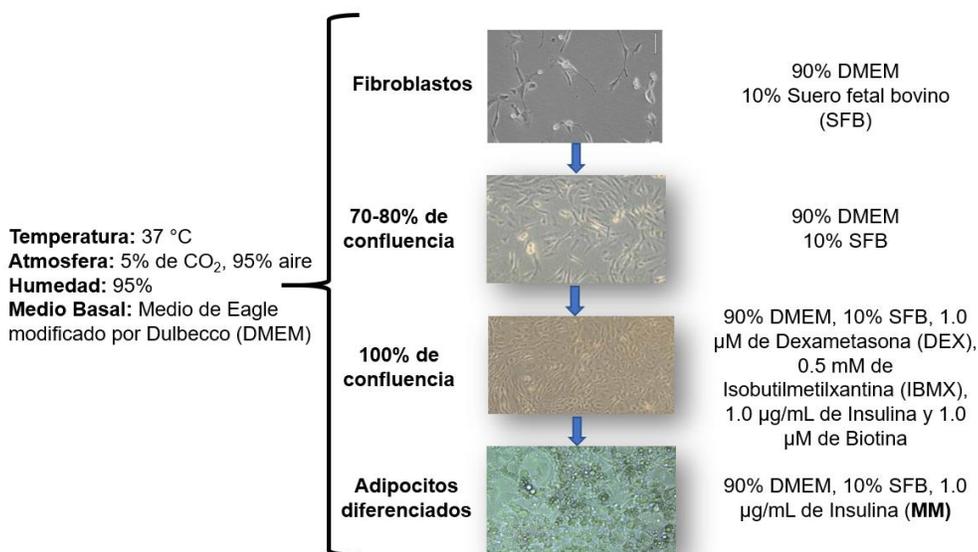


Figura 27. Diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 en cultivo (Adaptada de ATCC, 2016).

Los preadipocitos confluentes pueden diferenciarse de forma sincrónica mediante un coctel adipogénico; la DEX, un agonista glucocorticoide sintético, se usa tradicionalmente para estimular la vía del receptor de glucocorticoides. La MIX, un inhibidor de la fosfodiesterasa se usa tradicionalmente para estimular la ruta de la proteína cinasa dependiente de cAMPA.

6.2 Diseño experimental

Partiendo de adipocitos previamente diferenciados, se formaron 4 grupos; un primer grupo con adipocitos maduros como control, y tres grupos más con adipocitos maduros con diferentes concentraciones de vitaminas; el segundo grupo fue tratado con vitamina A (retinol) con concentraciones de 1, 5 y 10 µM, el tercer grupo con vitamina D (calcitriol) en concentraciones de 10, 50 y 100 nM y el cuarto grupo con vitamina E (α-tocoferol) con concentraciones de 10, 25 y 50 µM. Todos los tratamientos se sometieron a diferentes tiempos de exposición; 12, 24 y 48 horas. (Figura 28). Así como todos los experimentos se hicieron por triplicado (Mercader y col., 2008; Landrier y col., 2009; Lira y col., 2011).

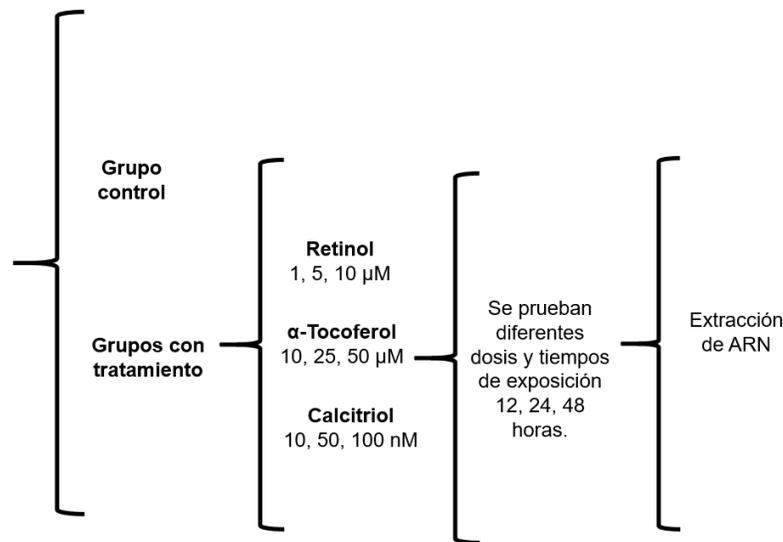


Figura 28. Diseño experimental. En este diagrama se muestran las diferentes concentraciones que se usaron para cada vitamina, así como los diferentes tiempos de exposición de cada tratamiento. Al finalizar el experimento, se extrajo el RNA total.

6.2.1 Obtención de las muestras:

Cada tratamiento al concluir su tiempo de exposición, se manipuló para la obtención de las siguientes muestras:

- *Muestra de RNA:* Se retiró el medio de los platos de cultivo y se añadieron 500 μL de trizol frío. Se lavó cada pozo con trizol y se recolectaron las muestras en tubos de plástico de 2 mL y se almacenaron a -70 °C.
- *Muestra para tinción:* Se retiró y desechó el medio de los platos de cultivo y se colocaron 2 mL de formalina por las paredes de cada pozo con mucho cuidado, para evitar romper la monocapa de células. Se dejó reposar a la formalina por aproximadamente 2 días, pasado este tiempo, la formalina se retiró y se lavó cada pozo con agua destilada para retirar los restos de formalina y finalmente fijar la muestra.

6.3 Tinción de las muestras con rojo oleoso O

La solución de rojo oleoso se preparó disolviendo 4.2 g del colorante en 1200 mL de isopropanol absoluto. Se mezclaron los reactivos y se dejó la solución durante toda la noche sin agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se filtró a través de papel filtro analítico 589-WH, Después de la filtración, se añadieron 900 mL de agua bidestilada y se dejó reposar la solución durante toda la noche a 4 °C sin agitación. Finalmente, la solución se volvió a filtrar tres veces más (Ramírez y col., 1992).

6.4 Extracción de RNA total

El RNA total de las células de todos los tratamientos se extrajo mediante un el meteodo de Trizol. Para obtener el DNA complementario (cDNA) mediante los siguientes pasos; *Separación*: Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente agragar 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de trizol. Cada mezcla se agitó durante 15 segundos para homogeneizar y se incubaron duarente 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C para obtener una fase acuosa, la cual fue removida y colocada en otro tubo de 2 mL. *Aislamiento*: A la fase obtenida se le agregaron 250 µL de isopropanol por cada 1 mL de trizol. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 minutos a 4 °C. *Lavado*: Se removió el sobrenadante y se mantuvieron solo los pellets, los cuales se lavaron con 500 µL de etanol al 75% por cada 500 µL de trizol. Las muestras se agitaron suavemente y se centrifugaron a 7,500 x g durante 5 minutos a 4 °C y se desechó el lavado, para dejar secar los pellets durante 10 minutos aproximadamente. *Resuspensión*: Se colocaron de 20 a 50 µL de agua SDS y se incubaron las muestras en un bloque térmico durante 15 minutos a 55 °C. Una vez obtenida las muestras se alacenaron a -70 °C hasta su uso (Chomczynsky, 1993; Chomczynsky y Sacchi, 1987).

6.5 PCR de punto final

A partir del cDNA se realizó una transcripción reversa usando un oligo (dT)12-18 (Sigma-Genosys, St. Louis, MO) y la enzima Super script II (Invitrogen). PCR punto final y el ancho de banda fueron utilizados para cuantificar la expresión de RBP-4. La expresión fue normalizada utilizando el gen actina. Los primers específicos para RBP-4 (Assays-on-Demand, Mm00803264_m1; Applied Biosystems) las condiciones de amplificación fueron 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y un ciclo de 95°C de 15 segundos y 60 segundos a 60°C para un total de 45 ciclos.

6.6 Análisis estadístico

Para comparar los promedios de cada tratamiento se realizoun análisis de varianza de una vía y la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism 6.

VII. RESULTADOS Y DICUSIONES

7.1 Diferenciación de adipocitos 3T3-L1

Las células 3T3-L1 son una línea muy utilizada en los estudios de adipogénesis y expresión de genes, debido a diversas ventajas que posee; es fácil de madurar, permite definir las etapas de diferenciación, se pueden identificar los factores que regulan la transcripción y responde homogéneamente a la administración de diversos tratamientos y cambios de condiciones, por lo cual, es un modelo muy utilizado para evaluar el efecto de compuestos y nutrientes en el proceso de adipogénesis y en estado diferenciado (Ruiz y col., 2016).

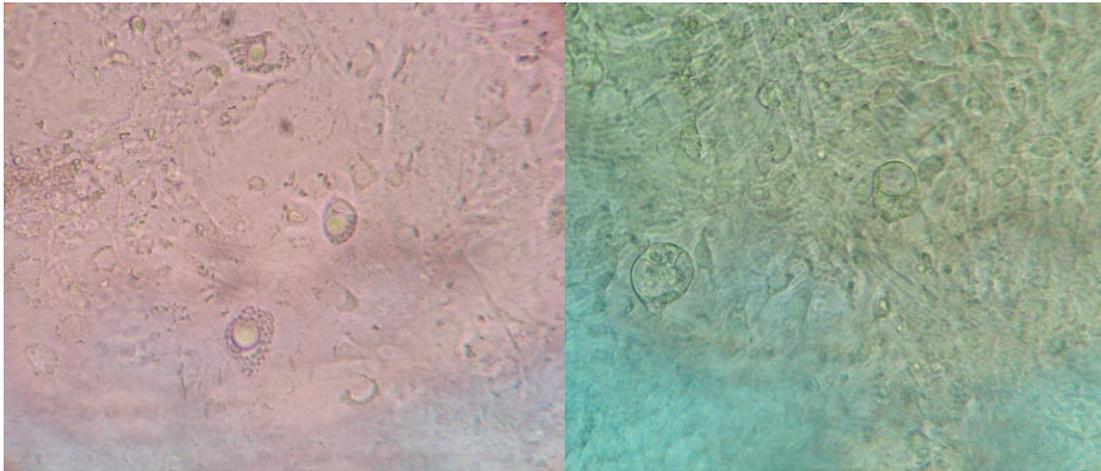


Figura 29. Vacuolas de grasa de adipocitos 3T3-L1 diferenciados. Microfotografía con objetivo 40X de adipocitos.

La acumulación de triglicéridos confirma la diferenciación de los fibroblastos en adipocitos 3T3-L1. Estos triglicéridos se acumulan en el citoplasma formando gotas de grasa (Figura 29).

7.2 Tinción de adipocitos 3T3-L1 con rojo oleoso

El rojo oleoso es un colorante utilizado para teñir las vacuolas de lípidos en el citoplasma de adipocitos diferenciados; el grado de tinción es proporcional a la

diferenciación y a la acumulación de triglicéridos y ésteres de colesterol (Ramírez y col., 1992).

En la Figura 30 se puede observar las placas de cultivo con las diferentes concentraciones y tiempos de exposición de retinol, las cuales fueron teñidas con rojo oleoso O, mostrando un posible efecto inverso en la acumulación de lípidos por parte de los adipocitos diferenciados, efecto ocasionado por la dosis y el tiempo de exposición de vitamina A, donde a mayor concentración de retinol y horas de exposición, hay menor coloración roja. Se utilizó el tiempo de 12 horas para las mediciones y ensayos debido a la homogeneidad en las tinciones.

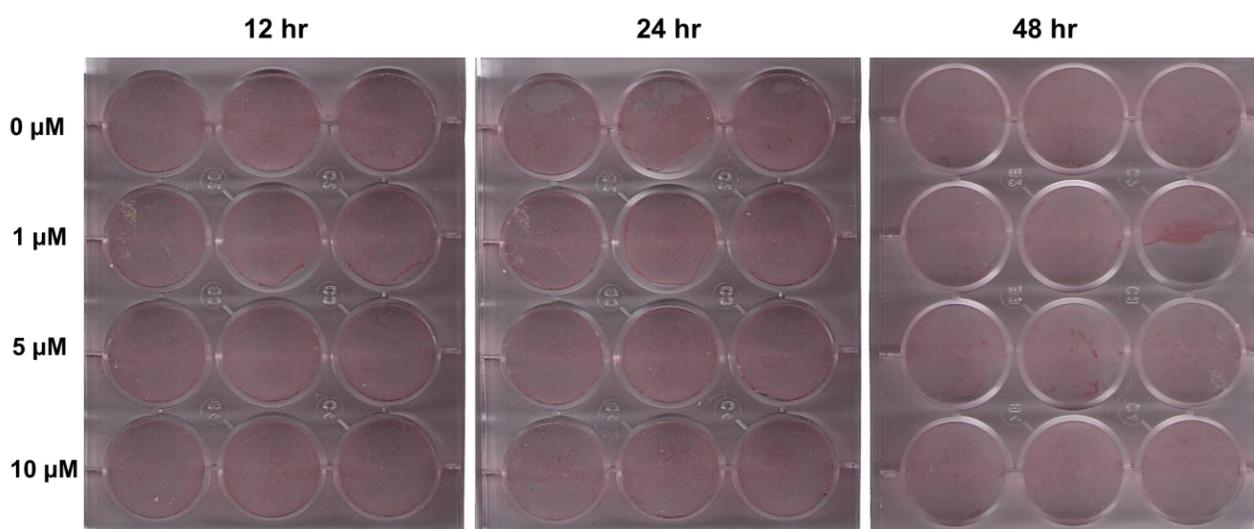


Figura 30. Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina A y teñidos con rojo oleoso O. Placas de cultivo de adipocitos 3T3-L1 con diferentes dosis de retinol y tiempos de exposición.

La intensidad de color rojo se analizó con el software Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss) mediante el sistema RGB. Sistema que se basa en la frecuencia de píxeles y la intensidad en un rango de 0-255. Para el presente análisis se cuantificó un total de 50,000 píxeles para cada dosis. En la Figura 31a se puede observar que el histograma de los adipocitos con 0 μ M de retinol tiene distribución normal con una mediana de 120 y una media de 120.30 ± 6.81 . Comparando el control con los otros tratamientos se puede observar que hay un decremento en

la máxima intensidad observada desde 238 para 0 μ M a 169, 200 y 198 para las dosis de 1, 5 y 10 μ M respectivamente, de igual manera hay un decremento en las medias de los tratamientos. El tratamiento con dosis de 5 μ M presenta una mayor frecuencia de pixeles de menor intensidad (103-113) asemejando su distribución al tipo binomial (Figura 31c). Un efecto similar es observado en la Figura 31d, correspondiente a los adipocitos con 10 μ M de retinol.

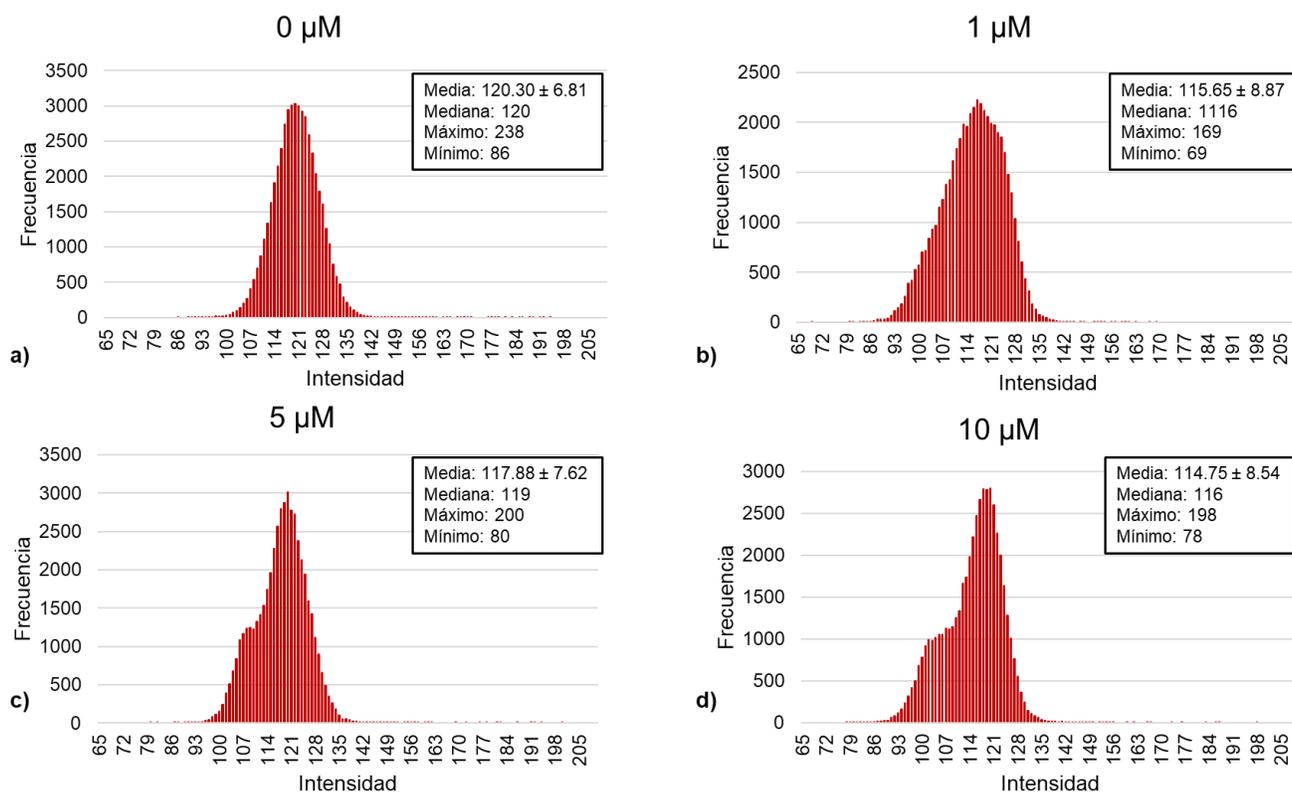


Figura 31. Histogramas de intensidad con el parámetro R en pixeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina A y teñidos con rojo oleoso O. a) concentración 0 μ M de retinol, b) concentración 1 μ M de retinol, c) concentración 5 μ M de retinol y d) concentración 10 μ M de retinol. Datos analizados en Zen 2.3 (Blue Edtion).

Se ha reportado con anterioridad que el ácido retinoico puede inhibir la diferenciación en preadipocitos o aumentar el metabolismo de lípidos en adipocitos diferenciados (Stoecker y col., 2017). El retinol administrado a los adipocitos 3T3-L1 puede ser convertido a retinaldehído y ácido retinoico.

Primeramente, la enzima aldehído deshidrogenasa (ADH1) cataliza el paso de la oxidación del retinol a retinal y posteriormente la enzima retinaldehído deshidrogenasa (RALDH) realiza la síntesis de ácido retinoico (Frey y Vogel, 2011). Como ya se mencionó con anterioridad, el ácido retinoico puede unirse a los receptores nucleares RXR, formando heterodímeros con los PPAR's dentro del núcleo, donde PPAR γ regula la expresión de genes del metabolismo de lípidos.

El tratamiento con la vitamina D presentó un efecto similar al observado con el retinol. La tinción con rojo oleoso O muestra que a mayor dosis y tiempo de exposición hay una menor coloración (Figura 32), de igual manera se utilizó el tiempo de 12 horas para las mediciones y ensayos posteriores.

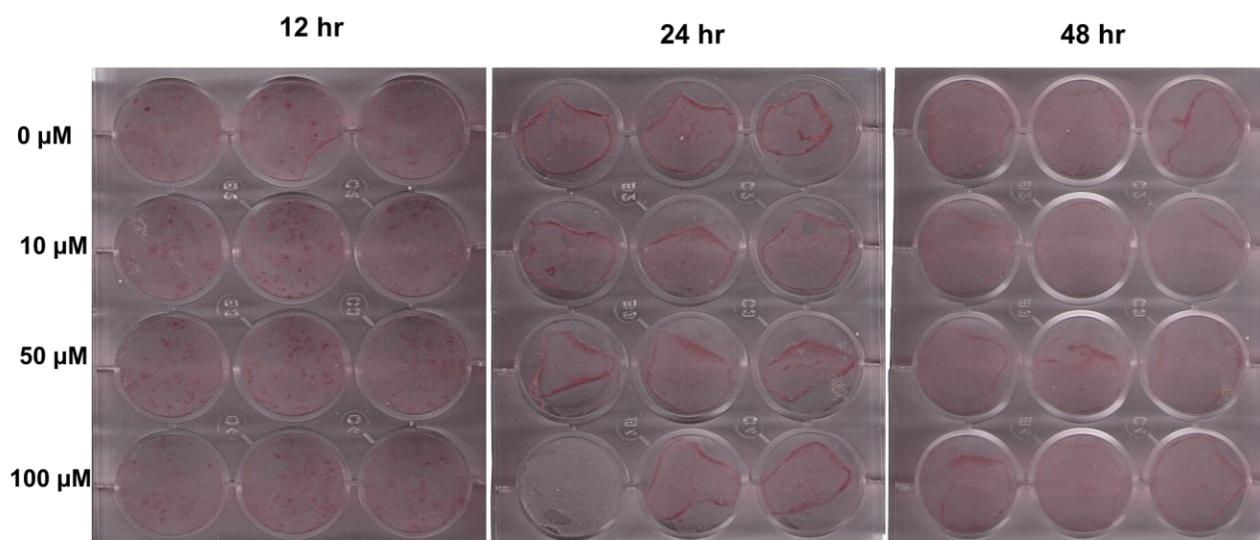


Figura 32. Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso O. Placas de cultivo de adipocitos 3T3-L1 con diferentes dosis y tiempos de exposición de calcitriol.

La intensidad de color rojo mostró en la Figura 33 que no hay mucha diferencia entre el control (Figura 33a) y las dos primeras dosis (Figura 33b y 33c) para el tiempo de 12 horas, sin embargo, para la dosis de 100 μM se puede observar en la distribución que disminuye la intensidad de los pixeles cuantificados. El tratamiento con calcitriol 100 μM presentó menor valor en el

máximo de intensidad observado, en la media y en la mediana respecto al control 0 μM (Figura 33d).

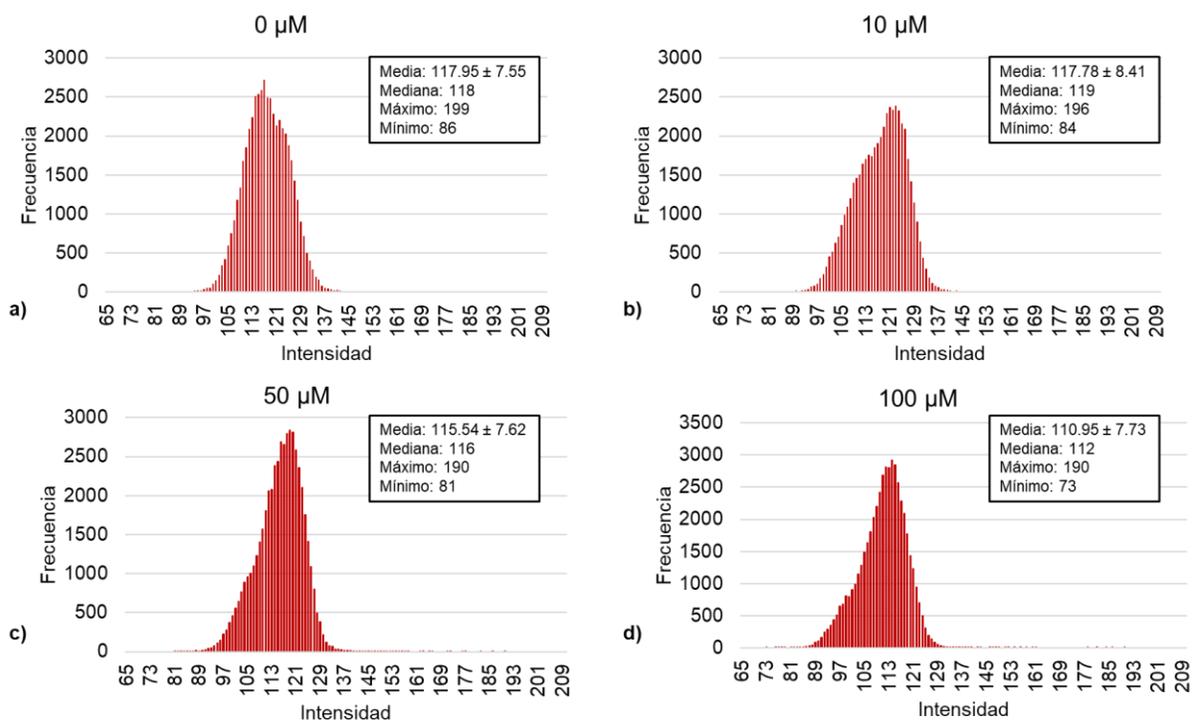


Figura 33. Histogramas de intensidad con parámetro R en pixeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso O. a) concentración 0 μM de calcitriol, b) concentración 10 μM de calcitriol, c) concentración 50 μM de calcitriol y d) concentración 100 μM de calcitriol. Datos analizados en Zen 2.3 (Blue Edtion).

Se ha sugerido que la suplementación con vitamina D₃ se puede usar para prevenir la aparición de la obesidad y los trastornos metabólicos asociados (Abbas, 2016). En un ensayo de control aleatorizado se encontró que la administración de suplementos de 25 mg/día de vitamina D a mujeres obesas y con sobrepeso durante 12 semanas causó pérdida de grasa sin afectar el peso corporal y la circunferencia de la cintura (Salehpour y col., 2012). De manera similar, en un modelo murino con obesidad inducida por dieta, en combinación con la administración de vitamina D, los ratones manifestaron pérdida de peso (Sergeev y col., 2014). Se estudió el efecto preventivo de la administración de

suplementos de vitamina D₃; la suplementación con vitamina D limita el aumento de peso inducido por la dieta rica en grasas, mejorando la oxidación de ácidos grasos, la liberación de insulina, la resistencia a la insulina y la absorción de glucosa estimulada por la insulina en los adipocitos (Borissova y col., 2003; Marcotorchino y col., 2014). Se ha demostrado que la [1,25-(OH)₂-D₃] refuerza la captación de 2-desoxiglucosa (derivado análogo de la glucosa) en condiciones basales en adipocitos 3T3-L1 a través de la modulación de la señalización de la insulina (Marcotorchino y col., 2014).

De manera similar a la Vitamina A y D se observó un efecto inversamente proporcional por el tiempo de exposición y concentración de α -tocoferol (Figura 34).

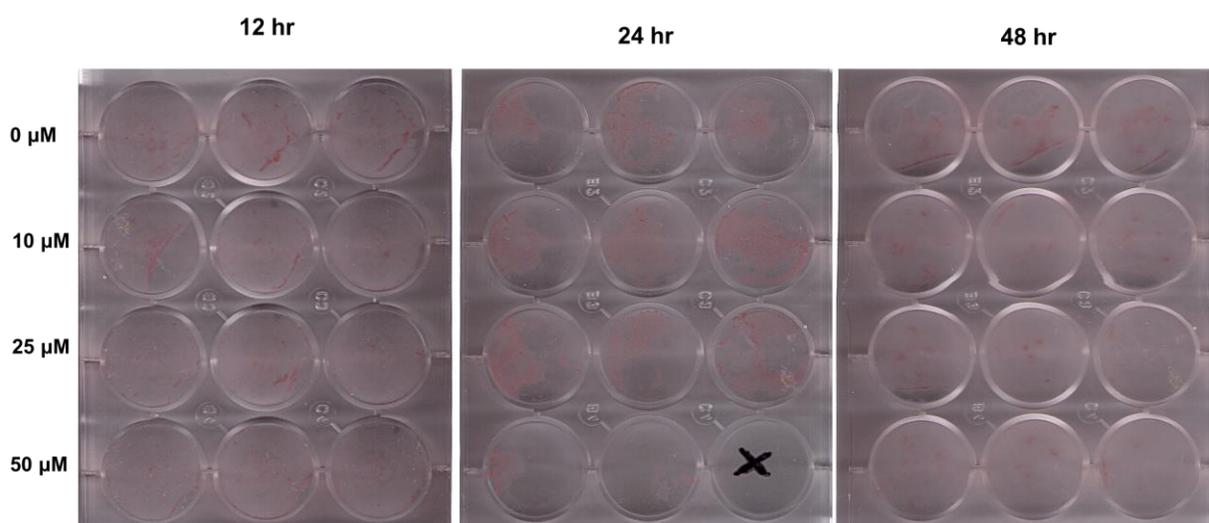


Figura 34. Adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina E y teñidos con rojo oleoso O. Placas de cultivo de adipocitos 3T3-L1 con diferentes dosis y tiempos de exposición de α -tocoferol.

La intensidad de color rojo confirma el efecto por la dosis donde la distribución de la frecuencia aumenta en píxeles de baja intensidad (Figura 35c) efecto mas notorio en la dosis mayor de 50 μ M con frecuencias de 1526 para píxeles de intensidad de 113 (Figura 35d).

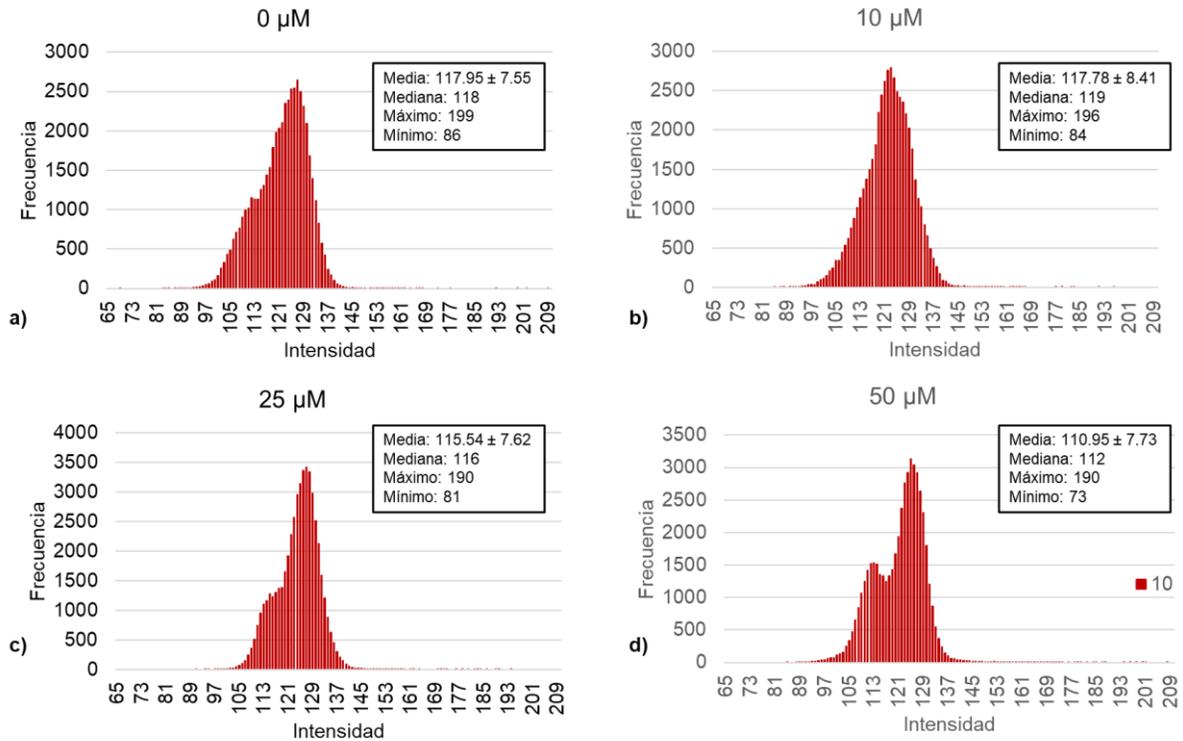


Figura 35. Histogramas de intensidad con parámetro R en píxeles de adipocitos 3T3-L1 tratados con vitamina D y teñidos con rojo oleoso. a) concentración 0 μM de α -tocoferol, b) concentración 10 μM de α -tocoferol, c) concentración 50 μM de α -tocoferol y d) concentración 100 μM de α -tocoferol. Datos analizados en Zen 2.3 (Blue Edition).

Como ya se hizo referencia el receptor nuclear PPAR γ se une a las vitaminas A y D que son solubles en grasa, por lo tanto, no sería irrazonable esperar que el α -tocoferol también pueda funcionar para controlar las vías basadas en la unión hipotética de receptores nucleares (Traber y Atkinson, 2007). Hay dos clases de receptores nucleares que responden a la modulación por la vitamina E; estos son el receptor de pregnano X (PXR) y los receptores PPAR. El receptor PXR regula una variedad de vías xenobióticas (compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente) y responde a una amplia gama de compuestos extraños potencialmente tóxicos (Moore y col., 2006). Con respecto a PXR, se ha reportado que los tocotrienoles son ligandos más efectivos que el α -tocoferol (Landes y col., 2003). De hecho, PXR

tiene una alta capacidad para unirse a gran una variedad de ligandos (Jones y col., 2000). Esta característica hace que PXR sea ideal para reconocer compuestos extraños, pero es improbable que la función de isoformas específicas del α -tocoferol se relacione con la unión a PXR. Este fenómeno de α -tocoferol es más probablemente un mecanismo involucrado en la prevención de la acumulación de exceso de vitamina E (Traber y Atkinson, 2007). Con respecto a los PPAR, específicamente PPAR γ , como ya se describió, se encuentra principalmente en el tejido adiposo e hígado y regula el almacenamiento de lípidos y el metabolismo de la glucosa (Michalik y col., 2006).

La troglitazona, un miembro de la familia de fármacos de las tiazolidindionas utilizada en el tratamiento para la diabetes tipo 2, fue uno de los primeros agentes farmacéuticos que actuó como un agonista de PPAR γ . La troglitazona es única ya que, a diferencia de otras tiazolidindionas, contiene dentro de su estructura un anillo cromano tipo α -tocoferol (Davies y col., 2002). De manera similar a la troglitazona, el α -tocoferol aumenta la expresión de PPAR γ en hepatocitos *in vitro*, (Chojkier, 2005; Masubuchi, 2006). En base a esto, los resultados obtenidos en cuanto a la modulación de PPAR γ por α -tocoferol han despertado un gran interés por su capacidad para funcionar como un ligando de PPAR γ (Traber y Atkinson, 2007).

7.3 Expresión de RBP-4

Se realizó la extracción de RNA y posteriormente se llevó a cabo la reacción de PCR tiempo final (RT-PCR), utilizando primers específicos para RBP-4 y actina como gen constitutivo (Cuadro 2). Las condiciones de amplificación fueron; 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y un ciclo de 95°C de 15 segundos y 60 segundos a 60°C para un total de 45 ciclos.

Gen	Secuencia	Longitud (bp)	Tm (°C)
RBP-4	F: 5'-ACTGGGGTGTAGCCTCCTTT-3'	61	54.6
	R: 5'-GGTGTCGTAGTCCGTGTCG-3'		
Actina	F: 5'-TAC AGC TTCACCACCACAGC-3'	60	54
	R: 5'-TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT-3'.		

Cuadro 2. Primers utilizados para la expresión de RBP-4 y Actina.

A continuación, podemos observar en la Figura 36 en el gel de electroforesis de agarosa 1% que el amplicon se encuentra en el tamaño esperado de acuerdo con la banda del marcador de peso molecular.

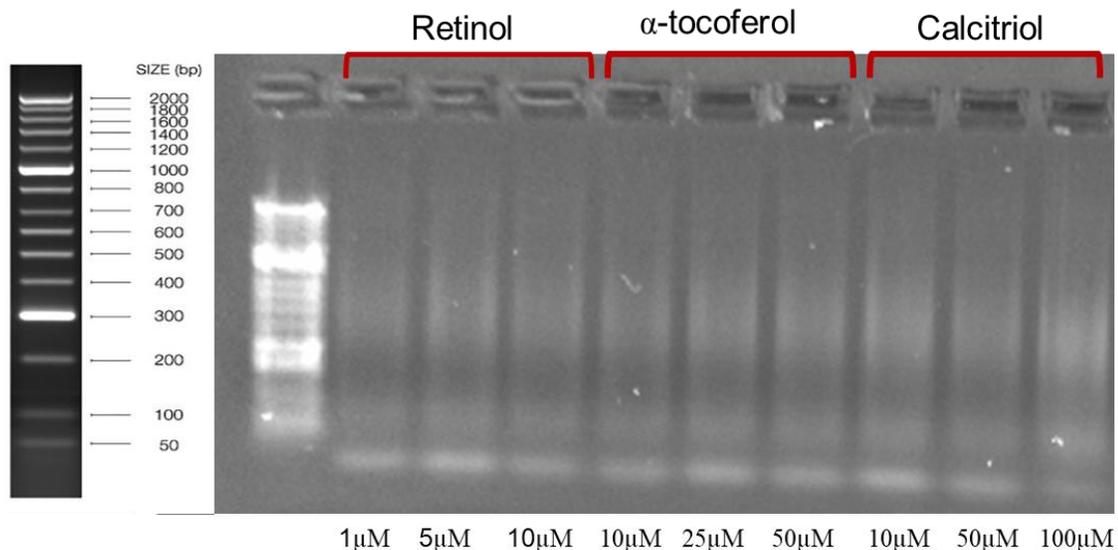


Figura 36. Gel de electroforesis de productos de PCR punto final. Se utilizó Hypperleader 50 bp como marcador de peso molecular.

Se decidió realizar una PCR en tiempo real utilizando las mismas condiciones para la reacción de la polimerasa. Se utilizó un termociclador de qPCR de la marca applied Biosystems Step One y Syber green como agente intercalante fluorescente.

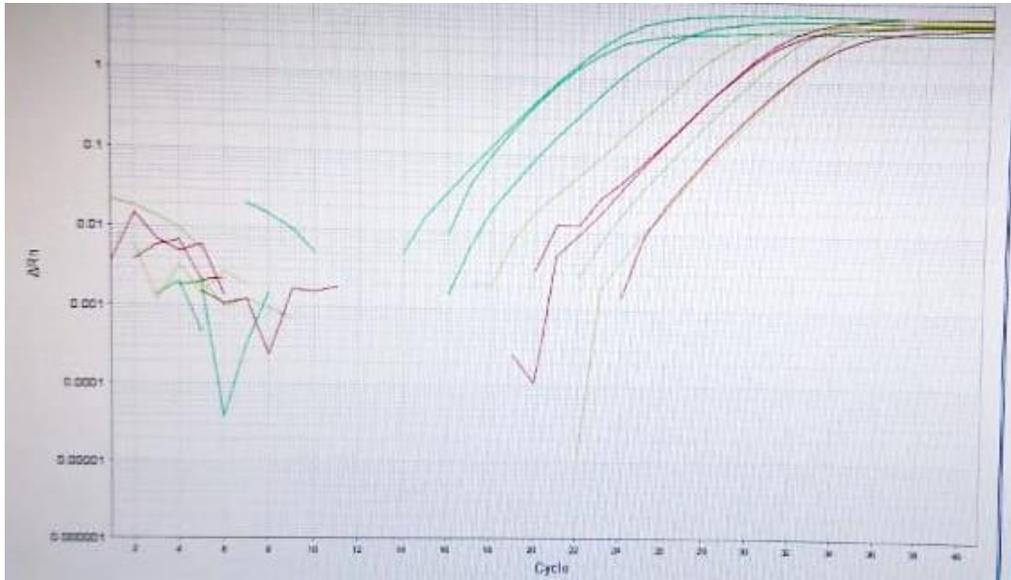


Figura 37. Expresión de los genes RBP-4 y Actina mediante PCR en tiempo real.

La reacción de PCR en tiempo real replicó los genes esperados, sin embargo, se puede observar en la Figura 37 que hubo replicación en el control negativo (agua inyectable). Posiblemente podría haber formación de dímeros de los primers. Los primers son el componente crítico al momento de realizar PCR tiempo real, los cuales deben ser específicos y debe optimizarse las condiciones para una correcta amplificación. La dimerización de primers es uno de los principales problemas encontrados durante la reacción de este tipo de PCR. Bustin y Huggit, 2017 sugieren que todos los trabajos donde se utilice la técnica antes mencionada deberían describir todas las condiciones utilizadas en su proyecto, esto con el fin de poder completar las condiciones adecuadas para llevar a cabo correctamente la reacción.

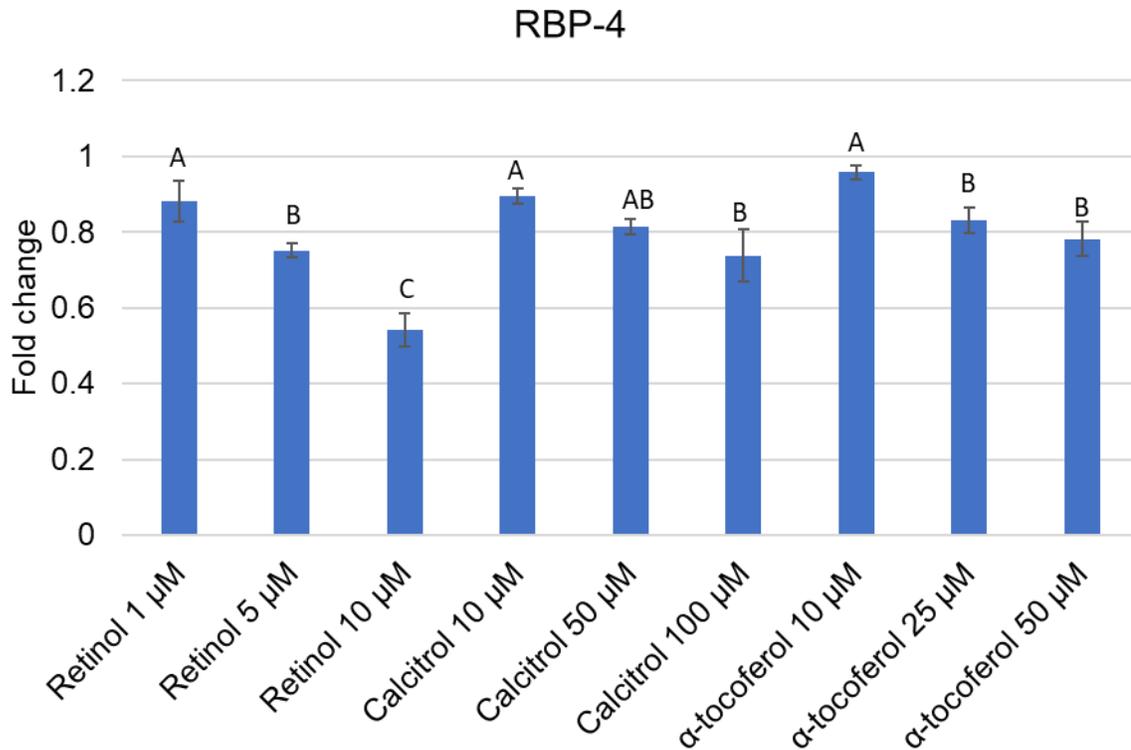


Figura 38. Cambio en expresión del gen RBP-4. Determinada con el método $2\Delta\Delta$ -CT. Los valores representan la media \pm Desviación Estandar. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con la prueba de Tukey-Kramer.

Para la expresión génica se utilizó el método de cuantificación relativa $2\Delta\Delta$ -CT, el cual es ampliamente usado y se basa en el ciclo de umbral (CT) que es el ciclo en el cual el nivel de fluorescencia alcanza una cierta cantidad (el umbral). Este método utiliza directamente la información de CT generada por un sistema qPCR para calcular la expresión génica relativa en muestras utilizando un gen de referencia como el normalizador (Rao y col, 2013).

La expresión de RBP-4 en los adipocitos 3T3-L1 es regulada por la administración de las vitaminas donde se puede observar que la vitamina A fue la que presentó un mayor decremento llegando a un cambio de 0.5432 ± 0.044 con la dosis de 10 µM, lo que representa casi un 50% de expresión. Como ya se comentó anteriormente el hecho de consumir mas vitamina A o retinol no influye

en que aumente el RBP-4 en circulación, lo cual, a nivel de tejido adiposo tampoco representaría un aumento en la expresión. La vitamina E presentó el menor decremento en la expresión en comparación con la vitamina A y D, siendo el tratamiento de 50 μ M con mayor efecto, disminuyendo la expresión en un 21.8%.

VIII. CONCLUSIONES

La administración de vitaminas A, E y D disminuye la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1 diferenciados, mostrando un efecto dosis respuesta.

La expresión de RBP-4 es regulada por efecto de la administración de vitaminas A, E y D en cultivos de adipocitos 3T3-L1, observándose un efecto inversamente proporcional a la concentración de vitamina.

El retinol disminuye la expresión de RBP-4 en mayor proporción comparado con el calcitrol y tocoferol.

IX. REFERENCIAS

- Abbas M. (2017). Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65(Pt B):369-381.
- Abumrad N, Davidson N. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev.* 92:1061-85.
- Acharya Y. (2018). The impact of vitamin A supplementation in childhood on adult outcomes: An exploration of mechanisms, timing of exposure, and heterogeneous effects. *Soc Sci Med.* 201:95-102.
- Acuff R, Thedford S, Hidiroglou N, Papas A, Odom T. (1994). Relative bioavailability of RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetate in humans: Studies using deuterated compounds. *Am J Clin Nutr.* 60: 397-402.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes, M y col. (2013). PPAR gamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.*19: 557-566.
- Ahsan H, Ahad A, Iqbal J, Siddiqui W. (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: A review. *Nutr Metab.* 11:52.
- Akeson A, y col. (1991). Inhibition of IL-1 beta expression in THP-1 cells by probucol and tocopherol. *Atherosclerosis* 86:261-270.
- Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res.* 54:1761-75.
- Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res.* 54:1761-75.
- Alminger M, Svelander C, Wellner A, Martinez R, Bialek L, Larque E, Perez F. (2012). Applicability of in vitro models in predicting the in vivo bioavailability of lycopene and β -carotene from differently processed soups. *Food Nutr Sci.* 3:477-489.
- Altiok S, Xu M, Spiegelman BM. (1997). PPAR γ induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.* 11:1987-98.
- American Heart Association (AHA). (2012).

- Arakelian C, Bazán N, Minckas N. (2010). La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físico-deportiva. *Rev int med cienc act fís deporte*. ISSN.1577:0354.
- Avram M, Avram A, James W. (2007). Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol*. 56:472-92.
- Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg J. (2004). Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann NY Acad Sci*. 1031:86-95.
- Bagés MC. (2013). Obesidad en pediatría y déficit de micronutrientes. *Rev Gastrohnp*. 15 (Suppl 2): S49-S51.
- Bailey R, West K, Black R. (2015). The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab*. 66 (Suppl 2): 22-33.
- Bakhtiyarova S, Lesnyak O, Kyznesova N, Blankenstein MA, Lips P. (2006). Vitamin D status among patients with hip fracture and elderly control subjects in Yekaterinburg, Russia. *Osteoporos Int*. 17:441-6.
- Balagopal P, y col. (2007). Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:1971-1974.
- Ballesteros P, y Arés I. (2004). Déficit nutricionales carenciales. *Endocrinol Nutr*. 51:218-24.
- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr D, Cowan S & Jones T. (1994). Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem*. 45:89-151.
- Barrera A, Rodríguez A, Molina M. (2013). Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 51:292-99.
- Bastarrachea R, López J, Bolado V, Téllez J, Laviada H, Comuzzie A. (2007). *Gac Méd Méx Vol*. 143 No. 6.
- Batres R, Olson J. (1987). A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin a among parenchymal and stellate cells in rat liver *J Nutr*. 117:874-9.
- Bellovino D, y col. (2003). Vitamin A transport: in vitro models for the study of RBP

- secretion. *Mol Aspects Med.* 24:411-420.
- Bergmann K & Sypniewska G. (2013). Diabetes as a complication of adipose tissue dysfunction. Is there a role for potential new biomarkers? *Clin Chem Lab Med.* 51: 177-85.
- Bernlohr D, Bolanowski M, Kelly T, Lane M. (1985). Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 260:5563-7.
- Berry D, Croniger C, Ghyselinck N, Noy N. (2012). Transthyretin blocks retinol uptake and cell signalling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol.* 32:3851-3859.
- Berry D, Jacobs H, Marwarha G, Gely-Pernot A, O'Byrne S, DeSantis D, Klopfenstein M, Feret B, y col. (2013). The STRA6 receptor is essential for retinol-binding protein-induced insulin resistance but not for maintaining vitamin A homeostasis in tissues other than the eye. *J Biol Chem.* 288:24528-24539.
- Berry D, Jin H, Majumdar A, Noy N. (2011). Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Nat Acad Sci.* 108:4340-5.
- Berry D, O'Byrne S, Vreeland A, Blaner W, Noy N. (2012). Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol.* 32:3164-3175.
- Bikle D. (2005). Vitamin D: role in skin and hair. In: Feldman D, ed. *Vitamin D.* Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 609-30.
- Bikle D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications, *Chem. Biol.* 21 319-329.
- Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5, 9-19.
- Birkenmeier E, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon J, Landschulz W, McKnight S. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev.* 3:1146-56.

- Birkenmeier E, Gwynn B, Howard S, Jerry J, Gordon J., Landschulz W, McKnight S. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes & Dev.* 3: 1146-1156.
- Blancas G, Almanza J, López R, Alarcón F, García R, Cruz M. (2010). *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol 67.
- Blaner W, Hendriks H, Brouwer A, y col. (1985). Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res.* 26:1241-51.
- Blaner W, Li Y. (2014). Vitamin A Metabolism, Storage and Tissue Delivery Mechanisms. *The Retinoids: Biology, Biochemistry, and Disease.* Capítulo 1. John Wiley & Sons, Inc.
- Blaner W, Obunike J, Kurlandsky S, y col. (1994). Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem.* 269:16559-65.
- Blomhoff R, Berg T, Norum K. (1988). Distribution of retinol in rat liver cells: effect of age, sex and nutritional status. *Br J Nutr.* 60:233-9.
- Blomhoff R, Helgerud P, Rasmussen M, y col. (1982). In vivo uptake of chylomicron [3H] retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 79:7326-30.
- Blomhoff R, Rasmussen M, Nilsson A, y col. (1985). Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *J Biol Chem.* 260:13560-5.
- Blot W, Li J, Taylor P. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst.* 85:1483-1492.
- Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Laina A, y col. (2000). Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 356:1213-1218.

- Borissova A, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. (2003). The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, *Int. J Clin Pract.* 57:258-261.
- Bouillon R, Bischoff H, Willett W. (2008). Vitamin D and health: Perspectives from mice and man. *J Bone Mineral Res.* 23:974-979.
- Brot C, Vestergaard P, Kolthoff N, Gram J, Hermann A, Sorensen O. (2001). Vitamin D status and its adequacy in healthy Danish perimenopausal women: relationships to dietary intake, sun exposure and serum parathyroid hormone. *Br J Nutr.* 86: (Suppl 1) S97-103.
- Brouwer D, van Beek J, Ferwerda, Brugman A, van der Klis F, van der Heiden H, Muskiet F. (1998). Rat adipose tissue rapidly accumulates and slowly releases an orally-administered high vitamin D dose. *Br J Nutr* 79. 527-532.
- Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, Eijken M, van Leeuwen J. (2008). Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability, *FEBS Letters.* 582:1618-1624.
- Burton G, Traber M, Acuff R, Walters D, Kayden H, Hughes L, Ingold K. (1998). Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:669-684.
- Bustin S, Huggett J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif.* 14: 19-28.
- Cai F, Dupertuis Y, Pichard C. (2012). Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 15:99-106.
- Campbell S, Stone W, Whaley S, Qui M, Krishnan K. (2003). Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 3:25.
- Cano I. (2003). Algoritmo de manejo diagnóstico y terapéutico de las carencias nutricionales. Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. Disponible

en: www.saludaliamedica.com/pmed/index.jsp.

- Cao Z, Umek R, McKnight S. (1991). Regulated expression of three C/EBP Isoforms during adipose conversión of 3T3-L1 cells. *Genes & Development*. 5:1538-1552.
- Carpentert K, Veen C, Hird R, Dennis I, Ding T, Mitchinson M. (1997). The carotenoids b-carotene, canthaxanthin, and zeaxanthin inhibit macrophage-mediated LDL oxidation. *FEBS Lett*. 401:262-6.
- Carvajal K, Hernández M, Moreno R. (2007). PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *S;4(Supl. 4):66-76*.
- Casanueva E, Rosello M, Unikel C. (2008). Alimentacion y nutricion en el adolescente. *Nutriología Médica*. Editorial Medica Panamericana. 119-140.
- Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre P. (1991). Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetes complications? *Diabetes Care*. 14:68-72.
- Chacón T, Esquivel P. (2013). Frutos tropicales como fuente de carotenoides: biosíntesis, composición, biodisponibilidad y efectos del procesamiento. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 4:001-023.
- Chappell L, Seed P, Briley A, Kelly F, Lee R, Hunt B, y col. (1999). Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomized trial. *Lancet*. 354:810-816.
- Chapuy M, Schott A, Garnero P, Hans D, Delmas P, Meunier J. (1996). Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:1129 -33.
- Chen T, Chimeh F, Lu Z, y col. (2007). Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 460:213-7.
- Cherniack E, Seldeen K, Troen B. (2014). Vitamin D: a regulator of metabolism and inflammation. *Curr Nutr Food Sci*. 10:3-11.

- Ching S, Kashinkunti S, Niehaus M, Zinser G. (2011). Mammary adipocytes bioactivate 25-hydroxyvitamin D and signal via vitamin D receptor, modulating mammary epithelial cell growth, *J Cell Biochem.* 112:3393-3405.
- Chojkier M. (2005). Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology.* 41:237-246.
- Christakos S, Ajibade D, Dhawan P, Fechner A, Mady L. (2010). Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 39:243-253.
- Christian P, West K, Khattry S, y col. (1998). Night blindness of pregnancy in rural Nepal-nutritional and health risks. *Int J Epidemiol.* 27:231-237.
- Christy R, Yang V, Ntambi J, Geiman D, Landschulz W, Friedman A, Nakabeppu Y, Lane M. (1989). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocytespecific genes. *Genes & Dev.* 3:1323-1335.
- Cinti S. (2002). Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest.* 25:823-35.
- Clemens T, Adams J, Henderson S, Holick M. (1982). Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet.* 74-76.
- Colquhoun A. (2010). Lipids, mitochondria and cell death: implications in neuro oncology. *Mol Neurobiol.* 42:76-88.
- Combs G. (1992). *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health.* San Diego, CA: Academic Press.
- Cornelius P, MacDougald O, Lane M. (1994). Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.* 14:99-129.
- Cowherd, R, Lyle R, McGehee R. (1999). Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Cell Dev Biol.* 10:3-10.
- Croker B, Kiu H, Nicholson S. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 19, 414-422.
- Cross H, Bareis P, Hofer H, Bischof M, Bajna E, Kriwanek S. (2001). 25-HydroxyvitaminD3-1-hydroxylase and vitamin D receptor gene expresión in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids.* 66:287-92.

- Curley R. (2012). Retinoid chemistry: synthesis and application for metabolic disease. *Biochim Biophys Acta*. 1821:3-9.
- D'Ambrosio D, Clugston R, Blaner W. (2011). Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3, 63-103.
- Davies G, McFie P, Khandelwal R, Roesler W. (2002). Unique ability of troglitazone to up-regulate peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 300:72-77.
- Dávila J, González J, Barrera A. (2015). Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 53:240-9.
- Dawson M, Xia Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim Biophys Acta*. 1821:21-56.
- Dawson-Hughes B, Heaney R, Holick M, Lips P, Meunier P, Vieth R. (2005). Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int*. 16:713-6.
- DeLuca H. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 80 (suppl):1689S-96S.
- Deming J. (2002). Psychrophiles and polar regions. *Curr Opin Microbiol*. 5:301-9.
- Deslex S, Negrel R, Ailhaud G. (1987). Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res*. 168:15-30.
- Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. (2012). Vitamin D signalling in adipose tissue, *Br. J Nutr*. 108:1915-1923.
- Ding C, Wilding J, Bing C. (2013). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects against macrophage-induced activation of NFkB and MAPK signalling and chemokine release in human adipocytes, *PLoS One*. 8:e61707.
- Drincic A, Armas L, Van Diest E, Heaney R. (2012). Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity, *Obesity*. 20: 1444-1448.
- Dusso A, Brown A, Slatopolsky E (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289:F8-28.
- Eckel R, Grundy S. (2006). Insensibilidad a la insulina y obesidad: la causa subyacente. *Diab Voic*. 51: 28-30.

- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de Medio Camino. (2016). Disponible en: <http://oment.uanl.mx/cifras-de-sobrepeso-y-obesidad-en-mexico-ensanut-mc-2016/>.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Resultados nacionales. (2012).
- Endres D & Rude R. (2005). Mineral and Bone Metabolism. En: Tietz. Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Elsevier Saunders. St. Louis, Missouri. p1920.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Oberreither S, Rotheneder M, el- Saadani M, y col. (1989). The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low-density lipoproteins. *Ann NY Acad Sci*; 570:254-67.
- Esteve E, Ricart W, Fernández J. (2009). Adipocytokines and Insulin Resistance: The possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care*. 32 (Suppl 2):S362-7.
- Esteve M. (2014). Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr*. 61:100-12
- Fain J, Cheema P, Bahouth S, Lloyd Hiler M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Bioche Biophys Res Commun*. 300: 674-678.
- Fajas L. (2003). Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med*. 35:79-85.
- Farjo K, Farjo R, Halsey S, Moiseyev G, Ma J. (2012). Retinol-Binding Protein 4 Induces Inflammation in Human Endothelial Cells by an NADPH Oxidase- and Nuclear Factor Kappa B-Dependent and Retinol-Independent Mechanism. *Mol Cell Biol*. 32(24): 5103–5115.
- Fechner H, Schlame M, Guthmann F, Stevens P, Rustow B. (1998). Alpha and delta-tocopherol induce expression of hepatic alpha-tocopherol-transfer protein mRNA. *Biochem J*. 331:577-581.
- Fedders R, Muenzner M, Schupp M. (2015). Retinol binding protein 4 and its membrane receptors: a metabolic perspective. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 22: 27-37.

- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, y col. (2011). Inflammation, oxidative stress and obesity. *Int J Molec Sci.* 12: 3117-32.
- Ferrante A. (2013). The Immune Cells in Adipose Tissue. *Diabetes Obes Metab.* 15: 34-38.
- Ferré P. (2018). The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes.* 53(suppl 1): S43-S50.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. (2000). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press.
- Foss Y. (2009). Vitamin, deficiency is the cause of common obesity, *Med. Hypotheses* 72 314-321.
- Francisco V, Pino1 J, González M, Mera A, Lago F, Gómez R, Mobasheri A, Gualillo O. (2018). Adipokines and inflammation: is it a question of weight? *Br J Pharmacol.* 175:1569-1579.
- Freedman L. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling, *Cell* 97 5-8.
- Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Varešlija D, Tipton K, Della Corte L. (2011). Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci.* 68:2067-2079.
- Frey S, Vogel S. (2011). Vitamin A Metabolism and Adipose Tissue Biology. *Nutrients.* 3: 27-39.
- Friedman A, Landschulz W, McKnight S. (1989). CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells• *Genes & Dev.* 3: 1314-1322.
- Friedman S. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev.* 88:125-72.

- Fujisawa S, Kadoma Y. (2005). Kinetic study of the radical-scavenging activity of vitamin E and ubiquinone In Vivo. 19:1005-1011.
- Gaillard D, Wabitsch M, Pipy B, Negrel R. (1991). Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. J Lipid Res. 32:569-79.
- Gao D, Trayhurn P, Bing C. (2013). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes, Int J Obes. 37:357-365.
- García G, Clavijo D, Ramón O, García A, Vittorino M, Casadiego C, Hernández S, y col. (2007). Aspectos biomédicos de la familia de las lipocalinas. Universitas Médica. vol. 48. núm. 2.
- Gee P. (2011). Unleashing the untold and misunderstood observations on vitamin E. Genes Nutr. 6:5-16.
- Geerts A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis. 21:311-35.
- Gernand A, Schulze K, Stewart C, West K, Christian P. (2016). Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. Nat Rev Endocrinol. 12: 274-289.
- Ghyselinck N, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson C, Hakansson H. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. EMBO J. 18:4903-4914.
- Giraldt M, Villarroya F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions. Endocrinology. 154:2992-3000.
- González E, Aguilar Cordero M, García García C, García López Pedro A, Álvarez Ferre J, Padilla López C. (2010). Leptina: un péptido con potencial terapéutico en sujetos obesos. Endocrinol Nutr. 57: 322-27.
- Goodman D, Huang H, Shiratori T. (1965). Tissue Distribution and Metabolism of Newly Absorbed Vitamin A in the Rat. J Lipid Res. 6:390-6.
- Gordon C, DePeter K, Estherann G, Emans S. (2004). Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. Arch Pediatr Adolesc Med. 158:531-7.

- Goti D, Reicher H, Malle E, Kostner GM, Panzenboeck U, Sattler W. (1998). Highdensity lipoprotein (HDL3)-associated alpha-tocopherol is taken up by HepG2 cells via the selective uptake pathway and resecreted with endogenously synthesized apo-lipoprotein B-rich lipoprotein particles. *Biochem J*:332:57-65.
- Graham T, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi T, Henry R, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. (2006). Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 354: 2552-2563
- Green H, Kehinde O. (1974). Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1:113-6.
- Green H, Kehinde O. (1975), An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 5:19-27.
- Green H, Kehinde O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*. 7:105-13.
- Green R, Hodges N, Chipman J, O'Donovan M, Graham M. (2008). Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Mutagenesis*. 23:457-463.
- Grégoire F, De Broux N, Hauser N, Heremans H, Van Damme J, Remacle C. (1992). Interferon-gamma and interleukin-1 beta inhibit adipoconversion in cultured rodent preadipocytes. *J Cell Physiol*. 151:300-9.
- Gregoire F, Smas C, Sul H. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 78:783-809.
- Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C. (1990). The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell*. 69:215-22.
- Grégoire F, Todoroff G, Hauser N, Remacle C. (1990). The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipoconversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol Cell* 69: 215-222.

- Gregor M, Hotamisligil G. (2011). Inflammatory mechanism in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-445.
- Grethen E, McClintock R, Gupta C, Jones R, Cacucci B, Diaz D, Fulford A, Perkins S. (2011). Vitamin D and hyperparathyroidism in obesity. *J Clin Endocrinol. Metab.* 96 1320-1326.
- Grotto I, Mimouni M, Gdalevich M, Mimouni D. (2003). Vitamin A supplementation and childhood morbidity from diarrhea and respiratory infections: a meta-analysis. *J Pediatr.* 142:297-304.
- Grygiel-Górniak B, Berger J, Moller D, Boitier E, Gautier J, Roberts R, Herz M. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. *Nutrition Journal*, 13:17.
- Grygiel-Górniak B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J.* 14;13:17.
- Guía de Práctica Clínica. (2016). Diagnóstico y tratamiento de dislipidemias (hipercolesterolemia) en el adulto. Evidencias y Recomendaciones Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-233-09.
- Guilherme A, Virbasius J, Puri V, Czech M. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 9:367-377.
- Gunanti I, Marks G, Al-Mamun A, Long K. (2014). Low serum concentrations of carotenoids and vitamin E are associated with high adiposity in Mexican-American children. *J Nutr.* 144:489-95.
- Gutiérrez J, Rivera J, Shamah T, Villalpando S, Franco A, Cuevas L, y col. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).
- Halberg N, Wernstedt I, Scherer P. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metabol Clin North Am.* 37:1-15.
- Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Current Diab Rev.* 2:367-373.
- Hamm J, Park B. & Farmer S. (2001). A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ activity during adipogenesis in 3T3-L1

- preadipocytes. *J Biol Chem.* 276:18464-18471.
- Hansen J, Zhang H, Rasmussen T, Petersen R, Flindt E, Kristiansen K. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem.* 276:3175-82.
- Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, y col. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2240-2207.
- Hassan M, Latif N, Yacoub M. (2012). Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol.* 9:689-702.
- Haussler M, Jurutka P, Mizwicki M, Norman A. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α , 25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: genomic and nongenomic mechanisms, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25:543-559.
- Heaney R, Recker R, Grote J, Horst R, Armas L. (2011). Vitamin D $_3$ is more potent than vitamin D $_2$ in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96:E447-452.
- Heller J. (1975). Interactions of plasma retinol-binding protein with its receptor. Specific binding of bovine and human retinol-binding protein to pigment epithelium cells from bovine eyes. *J Biol Chem.* 250:3613-3619.
- Helzlsouer K, Huang H, Alberg A, Hoffman S, Burke A, Norkus E, Morris J, Comstock G. (2000). Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92:2018-2023.
- Hess A, Unger L. (1921). The cure of infantile rickets by sunlight. *JAMA.* 77:39.
- Hess A. (1936). *Collected writings, volume I.* Springfield, IL: Charles C Thomas. 669-719.
- Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura, T, Yu R, y col. (2010). Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators inflammation.* 36:7838.
- Holick M, Biancuzzo R, Chen T, Klein E, Young A, Bibuld D, y col. (2008). Vitamin D $_2$ is as effective as vitamin D $_3$ in maintaining circulating concentrations of

- 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:677-681.
- Holick M, Chen T. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr.* 87:1080S-1086S.
- Holick M, Matsuoka L, Wortsman J. (1989). Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet.* 8671:1104-5.
- Holick M, Siris E, Binkley N, y col. (2005). Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:3215-24.
- Holick M. (2003). Vitamin D: A millennium perspective. *J Cell Biochem.* 88:296-307.
- Holick M. (2006). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 116:2062-72.
- Holick M. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 357:266-81.
- Holick M. (2008). Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes.* 9:87-98.
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, y col. (1997). Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS. Lett.* 409:105-158.
- Huang H, Appel L. (2003). Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J Nutr.* 133:3137-3140.
- Huldschinsky K. (1919). Ultraviolet irradiation of rachitic children. *Deutsche Med Wochenschr.* 45:712-3.
- Ibrahim N, Eldeeb M, Abdelmonem T. (2016). Serum retinol binding protein 4 and nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Adv Res Biol Sci.* 3:71-79.
- Isken A, Golczak M, Oberhauser V, y col. (2008). RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab.* 7:258-68.

- Jensen, S.K.; Lauridsen, C. Alpha-tocopherol stereoisomers. *Vitam. Horm.* 2007, 76, 281-308.
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga M, Ames B. (2001). Gamma α -tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr.* 74:714-722.
- Jones S, Moore L, Shenk J, Wisely G, Hamilton G, McKee D, Tomkinson N, LeCluyse E, Lambert M, Willson T, Kliewer S, Moore J. (2000). The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol.* 14:27-39.
- Kaestner K, Christy R, Lane M. (1990). Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: Characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 87:251-255.
- Kamei Y, Kawada R, Kazuki T, Ono, Sugimoto E. (1993). Vitamin D receptor gene expression is up-regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 3T3-L1 preadipocytes, *Biochem Biophys Res Commun.* 193:948-955
- Kane A. (2012). Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1821:10-20.
- Kane M, Folias A, Napoli J. (2008). HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem.* 378:71-9.
- Karkeni E, Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Peiretti F, Darmon, Landrier J. (2015). Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice, *Endocrinology.* 156:1782-1793.
- Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820-825.
- Kawaguchi R, Yu J, Ter-Stepanian M, Zhong M, Cheng G, Yuan Q, Jin M, Travis G, Ong D, Sun H. (2011). Receptor-mediated cellular uptake mechanism that couples to intracellular storage. *ACS Chem Biol.* 6:1041-1051.
- Kawaguchi R, Yu J, Wiita P, Honda J, Sun H. (2008). An essential ligand-binding domain in the membrane receptor for retinol-binding protein revealed by large-scale mutagenesis and a human polymorphism. *J Biol Chem.*

283:15160-15168.

- Kawaguchi R, Zhong M, Kassai M, Ter-Stepanian M, Sun H. (2015). Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6. *Membranes (Basel)*. 28;5:425-53.
- Kayden HJ, Traber MG. (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*. 34:343-358.
- Kelly M y von Lintig J. (2015). STRA6: role in cellular retinol uptake and efflux. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 4:229-42.
- Kern P, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280: E745-51.
- Kim J, Wright H, Wright M & Spiegelman B. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:4333-4337.
- Kirsz K, Zieba D. (2012). The discovery of neuromedin U and its pivotal role in the central regulation of energy homeostasis. *Postepy Hig Med Dosw*. 16: 196-203.
- Kloötting N, Graham T, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason C, Fasshauer M, Schön M, Stumvoll M, Bluher M, Kahn B. (2007). Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab*. 6:79-87.
- Kumar M, Sunvold G, Scarpace P. (1999). Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *J Lipid Res*. 40:824-9.
- Kwok K, Lam K, Xu A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med*. 11;48:e215.
- Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Ruhl R, Bol GF, Glatt H, Brigelius-Flohe R. (2003). Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol*. 65:269–273.
- Landrier J, Marcotorchino J, Tourniaire F. (2012). Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology. *Nutrients*. 4:1622-1649.

- Larsen E, Mosekilde L, Foldspang A. (2004). Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res.* 19:370-8.
- Lee D, y col. (2012). Association of serum retinol binding protein 4 and insulin resistance in apparently healthy adolescents. *Metabolism.* 56:327-331.
- Lee J, Im J, Lee H, Shim J, Youn B, Lee D. (2007). Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity (Silver Spring)* 15:2225–2232.
- Lee Y, Jeong W. (2012). Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 27:75-9.
- Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. (2010). Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol Metab.* 21:676-83.
- Li E & Norris A. (1996). Structure/function of cytosolic vitamin A binding protein. *Annu Rev Nutr.* 16:205-234.
- Li J, Byrne M, Chang E, Jiang Y, Donkin S, Buhman K, Burgess J, Teegarden D. (2008). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ hydroxylase in adipocytes, *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 112:122-126.
- Li Y, Wongsiriroj N, Blaner W. (2014). The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 3:126-139.
- Lira F, Rosa J, Cunha C, Ribeiro E, Oller do Nascimento C, Oyama L, Mota J. (2011). Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D₃ in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation.
- Lodge J. (2005). Vitamin E bioavailability in humans. *J. Plant Physiol.* 162:79-96.
- Lorente-Cebrián S, Eriksson A, Dunlop T, Mejhert N, Dahlman I, Aström G, Sjölin E, y col. (2012). Differential effects of 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes, *Eur. J. Nutr.* 51:335-342.
- Lorenz A, Garlatti M, Valeria L, Martínez J. (2006). Vitamina D y sus derivados.

- Act Terap Dermatol. 29:31.
- MacDougald O, Cornelius P, Lin F, Chen S, Lane M. (1994). Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT-enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem.* 269:19041-7.
- MacDougald O, Lane M. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 64:345-73.
- Maire A, Alvarez S, Shankaranarayanan P, Lera AR, Bourguet W, Gronemeyer H. (2012). Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators. *Curr Top Med Chem.* 12:505-27.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* 13:9239.
- Manickavasagar B, McArdle A, Yadav P, Shaw V, Dixon M, Blomhoff R, Connor G y col. (2015). Hypervitaminosis A is prevalent in children with CKD and contributes to hipercalcemia. *Pediatr Nephrol.* 30:317-325.
- Marcotorchino F. Tourniaire J. Astier E. Karkeni M. Canault A. Marie-Josèphe B. David B. Monique M. Jean-Charles G. Benoit L. (2014). Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem.* 25:1077-1083.
- Marcotorchino J, Gouranton E, Romier B, Tourniaire F, Astier J, Malezet C, Amiot M, Landrier J. (2012). Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes, *Mol. Nutr. Food Res.* 56:1771-1782.
- Martin H. (2010). Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res.* 7;690:57-63.
- Marwaha RK, Tandon N, Reddy D, y col. (2005). y col. Vitamin D and bone mineral density status of healthy school children in northern India. *AmJ Clin Nutr.* 82:477-82.
- Marwarha G, Berry D, Croniger C, Noy N. (2013). The retinol esterifying enzyme LRAT supports cell signaling by retinol-binding protein and its receptor STRA6. *FASEB J.* 28:26-34.

- Masubuchi Y. (2006). Metabolic and non-metabolic factors determining troglitazone hepatotoxicity: a review. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21:347-356.
- Matsuda T, Tao H, Goto M, Yamada H, Suzuki M, Wu Y, Xiao N, He Q, Guo W, Cai Z, Kurabe N, Ishino K, Matsushima Y, Shinmura K, Konno H, Maekawa M, Wang Y, Sugimura H. (2013). Lipid Peroxidation-Induced DNA Adducts in Human Gastric Mucosa. *Carcinogenesis.* 34:121-7
- Matsuoka L, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin J, Holick M. (1987). Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:1165-8.
- Mawer E, Backhouse J, Holman C, Lumb G, Stanbury S. (1972). The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues, *Clin. Sci.* 43: 413-431.
- Mawer E, Hayes M, Heys S, Davies M, White A, Stewart M, Smith, G. (1994). Constitutive synthesis of 1,25- dihydroxyvitamin D3 by a human small cell lung cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:554-60.
- McCarty M, Thomas C. (2003). PTH excess may promote weight gain by impeding catecholamine-induced lipolysis-implications for the impact of calcium, vitamin D, and alcohol on body weight, *Med. Hypotheses.* 61:535-542.
- McCary C, Yoon Y, Panagabko C, Cho W, Atkinson J, Cook-Mills J. (2012). Vitamin E isoforms directly bind PKC α and differentially regulate activation of PKC α . *Biochem J.* 441:189-198.
- Menozi I, Vallese F, Polverini E, Folli C, Berni R, Zanotti G. (2017). Structural and molecular determinants affecting the interaction of retinol with human CRBP1. *J Struct Biol.* 197:330-339.
- Mercader J, Granados N, Bonet M, Palou A. (2008). All-Trans Retinoic Acid Decreases Murine Adipose Retinol Binding Protein 4 Production. *Cell Physiol Biochem.* 22:363-372.

- Michalik L, Auwerx J, Berger J, Chatterjee V, Glass C, Gonzalez F, Grimaldi P, y col. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 58:726-741.
- Miller E, Erlinger T, Appel L. (2006). The effects of macronutrients on blood pressure and lipids: an overview of the DASH and Omni Heart trials. *Curr Atheroscler Rep.* 8:460-5.
- Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. (2008). Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 122:398-417.
- Monaco H. (2000). The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochim Biophys Acta.* 1482: 65-72.
- Moore D, Kato S, Xie W, Mangelsdorf D, Schmidt D, Xiao R, Kliewer S. International Union of Pharmacology. LXII. (2006). The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnene X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev.* 58:742-759.
- Moreno M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Rev Med Clin Condes.* 23:124-128.
- Mosca L, Rubenfire M, Mandel C, Rock C, Tarshis T, Tsai A, y col. (1997). Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 30:392-9.
- Müller L, Theile K, Böhm V. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma (2010). *Mol Nutr Food Res.* 54:731-742.
- Mustacich D, Shields J, Horton R, Brown M, Reed D. (1998). Biliary secretion of alpha-tocopherol and the role of the mdr2 P-glycoprotein in rats and mice. *Arch Biochem Biophys.* 15:350:183-192.
- Nagle C, Klett E, Coleman R. (2009). Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* 50:S74-S79.

- Nagpal S, Na S, Rathnachalam S. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands, *Endocr Rev.* 26:662-687.
- National Institutes of Health (NIH). (2016). Vitamin D. Office of dietary Supplements, NIH. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>
- National Institutes of Health (NIH). (2018). Vitamina A. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-DatosEnEspanol/>.
- Naylor H, Newcomer M. (1999). The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry.* 38:2647-53.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C y col. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 30;384:766-81.
- Niki E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 1:469-484.
- NOM-008-SSA3-2010 Norma Oficial Mexicana Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.
- Norman A. (2003). Cholecalciferol. *Physiology. Encyclopedia of Human Nutrition.* Academic Press. p.1213-1220.
- Norman A. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr.* 88: 491S-499S.
- Nossoni Z, Assar Z, Yapici I, Nosrati M, Wang W, Berbasova T, Vasileiou C, y col. (2014). Structures of holo wild-type human cellular retinol-binding protein II (hCRBP II) bound to retinol and retinal. *Acta Cryst. D70,* 3226-3232.
- Noy N, Slosberg E, Scarlata S. (1992). Interactions of retinol with binding proteins: studies with retinol binding protein and with transthyretin. *Biochemistry.* 31: 11118-24.
- Noya N, Lia L, Abola M y Berger N. (2015). Is retinol binding protein 4 a link between adiposity and cancer? *Horm Mol Biol Clin Invest.* 23:39-46.

- Ntambi J, Kim Y. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 130(suppl): S3122-6.
- O'Byrne S y Blaner W. (2013). Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *Journal of Lipid Research.* *J Lipid Res.* 54:1731-43.
- O'Byrne S, Wongsiriroj N, Libien J, y col. (2005). Retinoid Absorption and Storage Is Impaired in Mice Lacking Lecithin: Retinol Acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem.* 280:35647-57.
- O'Byrne SM, Blaner WS. (2013). Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *J Lipid Res.* 54:1731-43.
- Ohrvall M, Tengblad S, Vessby B. (1993). Lower tocopherol serum levels in subjects with abdominal adiposity. *J Intern Med.* 234:53-60.
- Olson J. (1994). Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in human. *Pure and Applied Chemistry.* 66:1011-1016.
- Ong D. (1984). A novel retinol-binding protein from rat-purification and partial characterization. *J Biol Chem.* 259:1476-1482.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2002). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2002.* ISBN. 92-5-304762-3.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2004). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo.* Colección FAO: Alimentación y nutrición. No. 29.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2015). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo.* ISBN 978-92-5-308785-3.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2017). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo.* ISBN 978-92-5-309888-0.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014). *Plan de acción para la prevención de la obesidad en la niñez y adolescencia.*
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017). *Obesidad y sobrepeso.*

- O'Rourke R, Metcalf M, White A, Madala A, Winters B, Maizlin I, y col. (2009). Depot specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes.* 33:978-990.
- Pairault J, Green H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:5138-42.
- Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Gliugliano D, Varricchio M, y col. (1993). Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care.* 16:1433-1437.
- Park E, Roesler W, Liu J, Klemm D, Gurney A, Thatcher J, Shuman J, Friedman A, (1990). The role of the CCAAT/enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *Mol Cell Biol.* 10:6264-6272.
- Parlee S, Lentz S, Mori H, Macdougald. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537:93-122.
- Parsons W, Ramkumar V, Stiles G. (1988). Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, G1. *Mol Pharmacol.* 34:37-41.
- Pauling L. (2018). Disponible en: <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-A>.
- Peh H, Tan W, Liao W, Wong W. (2016). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacol Ther.* 162:152-169.
- Penniston KL, Tanumihardjo SA. (2006). The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr.* 83:191-201.
- Pike J, Meyer M. (2014). Fundamentals of vitamin D hormone regulated gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144(Pt. A)5-11.
- Plum L, DeLuca H. (2009). The Functional Metabolism and Molecular Biology of Vitamin D Action. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism.* 7: 20-41.

- Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G. (2008). 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol Aspects Med.* 29:67-71.
- Polyzos S, Kountouras J, Mantzoros C. (2016). Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 65:1062-79.
- Popkin B, Adair L, Ng S. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 70:3-21.
- Prapunpoj P. (2009). Evolutionary changes to transthyretin. *FEBS J.* 276: 5329.
- Prieto P, Pérez P, Fernández M, Bustos M, Martínez J, Moreno. (2011). Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach. *Biochim Biophys Acta* 1807:664-678.
- Quintero F, Botero V, D'Agostino D, Delgado L, Dewaele M, Guzmán C, Játiva E y col. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Review and update. Working group of the Latinamerican Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (LASPGHAN). *Acta Gastroenterol Latinoam.* 46:246-264.
- Raimann (2011). Obesity and obesity-associated complications. *Med Clin Condes.* 22:20-26.
- Ramírez J, Castro F, Kuri W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* 97(6):493-7.
- Ramji D, Foka P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 365, 561-575.
- Ramsey BW, Farell PM, Pencharz P. Committee C. (1992). Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. *Am J Clin Nutr.* 55:108-116.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data análisis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 3:71-85.
- Rask L, Peterson P. (1976). In vitro uptake of vitamin a from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small intestine.

- J. Biol. Chem. 251, 6360-6366.
- Rhee E, Nallamshetty S, Plutzky J. (2012). Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochim Biophys Acta*. 1821:230-40.
- Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. (2004). Retinoic acid administration and vitamin A status modulate retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels in mouse brown adipose tissue. *Mol Cell Biochem*. 266:25-30.
- Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, y col. (1999). Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes*. 4:699-705.
- Rimbach G, Minihane A, Majewicz J, Fischer A, Pallauf J, Virgli F, Weinberg P. (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc*. 61:415-425.
- Rimbach G, Moehring J, Huebbe P, Lodge J. (2010). Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules*.15:1746-1761.
- Rochel N, Wurtz J, Mitschler A, Klaholz B, Moras D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* .173-179.
- Romero E, Campollo O, Castro J, Cruz R, Vásquez E. (2006). Hábitos de alimentación e ingestión de calorías en un grupo de niños y adolescentes obesos. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 63:187-95.
- Rosen E, MacDougald O, Walkey C, Puigserver P & Spiegelman B. (2007). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 14:1293-1307.
- Rosen E, MacDougald O. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 885-96.
- Rosenstreich S, Rich S, Volwiler W. (1971). Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J. Clin. Invest*. 50:679-687.
- Ross A, Manson J, Abrams S, Aloia J, Brannon P, Clinton S, y col. (2011). The report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab*. 96:53-58.
- Rothman K, Moore L, Singer M, Nguyen U, Mannino S, Milunsky A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med*. 333:1369-73.

- Roy P, Nadeau M, Valle, Bellmann K, Marette A, Tchernof A, Gagnon C. (2015). Vitamin D reduces LPS-induced cytokine release in omental adipose tissue of women but not men, *Steroids* 104:65-71.
- Rubin C, Hirsch A, Fung C, Rosen O. (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 253:7570-8.
- Rubin C, Lai E, Rosen O. (1977). Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development. *J Biol Chem.* 252: 3554-3557.
- Rucker D, Allan J, Fick G, Hanley D. (2002). Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians. *Canadian Medical Association Journal.* 166:1517-1524.
- Russell T, Ho R. (1976). Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: Triggering of differentiation by prostaglandin F₂~ and 1-methyl-3-isobutylxanthine. *Proc. Natl Acad Sci.* 73:4516-4520.
- Rutkowski J, Stern J, Scherer P. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208:501-512.
- Ryynänen J, Neme A, Tuomainen T, Virtanen J, Voutilainen S, Nurmi T, Mello V, Uusitupa M, Carlberg C. (2014). Changes in vitamin D target gene expression in adipose tissue monitor the vitamin D response of human individuals, *Mol Nutr Food Res.* 58:2036-2045.
- Saeed A, Dullaart R, Schreuder T, Blokzijl H, Faber K. (2017). Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients.* Dec;29:10.
- Salehpour A, Hosseinpanah F, Shidfar F, Vafa M, Razaghi M, Dehghani S, Hoshiarrad A, Gohari. (2012). A 12-week double-blind randomized clinical trial of vitamin D3 supplementation on body fat mass in healthy overweight and obese women, *Nutr. J.* 11:78-85.
- Salmerón C. (2018). Adipogenesis in fish. *J Exp Biol.* 7;221(Pt Suppl 1).
- Saltiel A & Olefsky J. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* 127:1-4.

- Sam S, Mazzone T. (2014). Adipose tissue changes in obesity and the impact on metabolic function. *Transl Res.* 164:284-92.
- Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. (2005). Amelioration of osteoporosis and hypovitaminosis d by sunlight exposure in hospitalized, elderly women with Alzheimer's disease: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res.* 20:1327-33.
- Scherberich A, Di Maggio N, McNagny K. (2013). A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue. *World J Stem Cells.* 26;5:1-8.
- Schneider C. (2009). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol Nutr Food Res.* 53:315-321.
- Schwartz G, Whitlatch L, Chen T, Lokeshwar B, Holiick M. (1998). Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7:391-5.
- Scott R, Florine D, Wille J, Yun K. (1982). Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79:845-9.
- Sergeev I, Song Q. (2014). High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 58:1342-1348.
- Shi H, Clegg D. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behavior.* 97:199-204.
- Shin S, Kim K, Kim J, Yoon S, Choi I, Yang Y. (2003). Dexamethasone reverses TGF-beta-mediated inhibition of primary rat preadipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 543:25-30.
- Smith P, Wise L, Berkowitz R, Wan C, Rubin C. (1988). Insulin-like growth factor-1 is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 263:9402-8.
- Snijder M, Dekker J, Visser M, Bouter L, Stehouwer C, Kostense P, y col. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J*

- Clin Nutr. 77:1192-1197.
- Soprano D, Blaner W. (1994). Plasma retinol-binding protein. The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. Raven Press Ltd. 257-81.
- Soprano D, Soprano K, Goodman D. (1986). Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 27:166-171.
- St-Arnaud R. (2008). The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 473:225-230.
- Starr R, Willson T, Viney E, Murray L, Rayner J, Jenkins B, Gonda T, Alexander W, Metcalf D, Nicola N, Hilton D. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921.
- Steinberger J, Daniels S, Eckel R, Hayman L, Lustig R, McCrindle B, Mietus-Snyder M. (2009). Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents a scientific statement from the american heart association atherosclerosis, hypertension, and obesity in the young committee of the council on cardiovascular disease in the young. *Circulation*. 119:628-647.
- Stephensen C. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *Ann Rev Nutr*. 21:167-192.
- Stocker P, Lesgards J, Vidal N, Chalier F, Prost M. (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: Antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim Biophys Acta*.1621:1-8.
- Stoecker K, Sass S, Theis F, Hauner H, Pfaffl M. (2016). Inhibition of fat cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes by all-trans retinoic acid: Integrative analysis of transcriptomic and phenotypic data. *Biomol Detect Quantif*. 11:31-44.
- Strauss W, Nagaraja J, Landgraf A, Arteaga S, Fawcett S, Ritchie L, John L, y col. (2018). Healthy Communities Study Team. *Suppl* 1:82-92.
- Student A, Hsu R, Lane M. (1980). Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem*. 255:4745-4750.
- Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y. (2012). Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J*. 59:849-857.

- Sullivan S, Rosen C, Halteman W, Chen T, Holick M. (2005). Adolescent girls in Maine at risk for vitamin D insufficiency. *J Am Diet Assoc.* 105:971-4.
- Sun X, Zemel M. (2004). Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis, *FASEB J.* 18:1430-1432.
- Suryawan A, Swanson L, Hu C. (1997). Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J Anim Sci.* 75:105-11.
- Suwa H, Kishi H, Imai F, Nakao K, Hirakawa T, Minegishi T. (2016). Retinoic acid enhances progesterone production via the cAMP/PKA signaling pathway in immature rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 12;8:62-67.
- Suzuki Y, Tsuchiya M, Wassall S, Choo Y, Govil G, Kagan V, Packer L. (1993). Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry.* 32:10692–10699.
- Talayero B, Sacks M. (2011). The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol.* 13: 544-552.
- Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga, M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 51:2045-2055.
- Tan B, Chen J, Lehnert H, Kennedy R, Randeve H. (2007). Raised serum, adipocyte, and adipose tissue retinol-binding protein 4 in overweight women with polycystic ovary syndrome: effects of gonadal and adrenal steroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:2764-72.
- Tang Q, Zhang J, Daniel Lane M. (2004). Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;319:235-9.
- Tanumihardjo SA, Furr HC, Amedee-Manesme O, y col. (1990). Retinyl ester (vitamin A ester) and carotenoid composition in human liver. *Int J Vitam Nutr Res.* 60:307-13.

- Tchkonia T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse R, et al. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:267-277.
- Thacher T, Fischer P, Strand M, Pettifor J. (2006). Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Ann Trop Paediatr.* 26:1-16.
- Thomas C, Mackey MM, Diaz AA, Cox DP. (2009). Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. *Redox Rep.* 14:102-108.
- Tilg H, Moschen A. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6:772-83.
- Tontonoz P, Hu E & Spiegelman B. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipidactivated transcription factor. 1147-1156.
- Torricelli P, Caraglia M, Abbruzzese A, Beninati S. (2012). γ -Tocopherol inhibits human prostate cancer cell proliferation by up-regulation of transglutaminase 2 and down-regulation of cyclins. *Amino Acids.* 44:45-51.
- Townsend K, Tseng Y. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 25:168-77.
- Traber M, Kayden H. (1989). Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 49:517-526.
- Traber M, Sies H. (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr.* 16:321-347.
- Traber M. (2006). Vitamin E. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 396-411.
- Traber M. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 27:347-362.
- Traber MG, Kayden HJ. (1989). Alpha-tocopherol as compared with gamma-tocopherol is preferentially secreted in human lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci.* 570:95-108.

- Trayhurn P, O'Hara A, Bing C. (2011). Interrogation of microarray datasets indicates that macrophage-secreted factors stimulate the expression of genes associated with vitamin D metabolism (VDR and CYP27B1) in human adipocytes. *Adipobiology* 3:29-34.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 26:348:2599-2608.
- Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, Chope G, Hyppönen E, Berry J, Vieth R, Lanham-New S. (2012). Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 95:1357-1364.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, y col. (1992). Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem.* 267:1805-10.
- Tyagi S, Gupta P, Singh-Saini A, Kaushal S, Sharma S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2:236-240.
- Umek R, Friedman A, McKnight S. (1991). CCAAT/enhancer binding protein: A component of a differentiation switch. *Science.* 251:288-292.
- Valdez R, Fausto J, Valadez I, Ramos A, Loreto O, Villaseñor M. (2012). Estado nutricional y carencias de micronutrientes en la dieta de adolescentes escolarizados de la Zona Metropolitana de Guadalajara, Jalisco. *Archivos latinoamericanos de nutrición.* Vol. 62 No. 2.
- Valero M, Zanuy, Hawkins F. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina. *Unidad de nutrición clínicay endocrinología. Dreemo.* 16:63-70.
- Vales M, Chavarría B, Martínez M, Díaz F, Velázquez J, Cuerda M, Bretón I. (2016). Deficiencia clínica de vitamina A tras bypass gástrico. Descripción de un caso clínico y revisión de la literatura. *Nutr Hosp.* 33:1008-1011.
- Vanlint S. (2013). Vitamin D and obesity, *Nutrients.* 5 949-956.
- Veerkamp J, van Kuppevelt T, Maatman R & Prinsen C. (1993). Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids.* 49:887-906.

- Vega GB. (2010). El adipocito y la respuesta inmune. *Rev Fac Med UNAM*. 53:43-45.
- Velasco M. (2016). La desnutrición y la obesidad: dos problemas de salud que coexisten en México. *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 83, No. 1.
- Vieth R. (1999). Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr*. 69:842-56.
- Viveros A, Laviada H, Bastarrachea R. (2002). Influencia endocrina y paracrina sobre la adipogénesis. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 10:151-164.
- Vizmanos B, Hunot C, Capdevila F. (2006). Alimentación y obesidad. *Rev Inv Salud*. 8:79-85.
- Vohl M, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, Hudson T, Tchernof A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obesity Research*. 12:1217-1222.
- Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, Silva ME, Santos RF. (2002). Depot specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone Metab Res*. 34:616-621.
- Wamberg L, Christiansen T, Paulsen S, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen S. (2013). Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue-the effect of obesity and diet-induced weight loss, *Int. J. Obes*. 37:651-657.
- Wang Y, Connors R, Fan P, Wang X, Wang Z, Liu J, Kayser F, y col. (2014). Structure-assisted discovery of the first non-retinoid ligands for Retinol-Binding Protein 4. *Bioorg Med Chem Lett*. 1;24:2885-91.
- Wiseman, E, Bar-El Dadon S, Reifen R. (2016). The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57;17: 3703-3714.
- Witztum J, Steinberg D. (1991). Role of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 88:1785-92.
- Wood R. (2008). Vitamin, and adipogenesis: new molecular insights, *Nutr. Rev*. 66:40-46.

- Woollard D, Indyk H. (2003) Cholecalciferol. Properties and determination. Encyclopedia of Human Nutrition. Academic Press. p. 1205-1213.
- Wortsman J, Matsuoka L, Chen T. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. Am J Clin Nutr. 72:690-693.
- Wozniak S, Gee L, Wachtel M, Frezza E. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ. A review article. Dig Dis Sci. 54:1847-56.
- Wu Z, Bucher N, Farmer S. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP beta, C/EBP delta, and glucocorticoids. Mol Cell Biol. 16:4128-36.
- Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni O, Zabolotny J, Kotani K, Quadro L, Kahn B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature. 436:356-362.
- Yang V, Christy R, Cook J, Kelly T, Lane M. (1989). Mechanism of regulation of the 422(aP2) gene by cAMP during preadipocyte differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 3629-33.
- Yao-Borengasser A, Varma V, Bodles A, Rasouli N, Phanavanh B, Lee M, Starks T, Kern L, Spencer H 3rd, Rashidi A, McGehee R Jr, Fried S, Kern P. (2007). Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone. J Clin Endocrinol Metab. 92:2590-2597.
- Yarwood S, Anderson NG, Kilgour E. (1995). Cyclic AMP modulates adipogenesis in 3T3-F442A cells. Biochem Soc Trans. 23:175S.
- Yeh W, Cao Z, Classon M, McKnight S. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. Genes Dev. 9:168-81.
- Yoshida Y, Niki E, Noguchi N. (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. Chem Phys Lipids. 123:63-75.
- Yoshikawa T. (1998). Alpha-Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. Biofactors 7:15-19.

- Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoudi M. (2015). Retinol binding protein 4 in relation to diet, inflammation, immunity, and cardiovascular diseases. *Adv Nutr.* 6:748-62.
- Zhang Z, Wang X, Cheng S, Sun L, Son Y, Yao H, Li W, Budhraj A, Li L, Shelton BJ, Tucker T, Arnold SM, Shi X. (2011). Reactive oxygen species mediate arsenic induced cell transformation and tumorigenesis through Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal adenocarcinoma DLD1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15:256:114-121.
- Zhang, R.Y, Liou, J.G, Cong, B.L. (1994). Petrogenesis of garnet-bearing ultramafic rocks and associated eclogites in the Su-Lu ultrahigh-pressure metamorphic terrane, China. *Journal of Metamorphic Geology.* 12:169-186.
- Zhong M, Kawaguchi R, Kassai M, y col. (2014). How free retinol behaves differently from rbp-bound retinol in RBP receptor-mediated vitamin A uptake. *Mol Cell Biol.* 34:2108-10.
- Zhong M, Sun H. (2015). A Genetic Clog in the Vitamin A Transport Machinery. *Cell.* 23;161:435-437.
- Zingg J, Azzi A. (2004). Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.*11:1113-1133.
- Zitterman A. (2003). Vitamin D in preventive medicine: Are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 89:552-572.