

**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura Nutrición**

**EFFECTO AGUDO DEL TIPO DE ACIDO GRASO Y
COLESTEROL EN LA DIETA SOBRE LA VIA DE
SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA Y FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA LIPOGENESIS
Y OXIDACION DE ACIDOS GRASOS**

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Nutrición

Presenta:

Nara Elizabeth Lara Pompa

Dirigida por

Dra. Nimbe Torres y Torres (Directora externa)

Dr. Elhadi Yahia Kazuz (Director interno)

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2010
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura Nutrición

**EFFECTO AGUDO DEL TIPO DE ACIDO GRASO Y COLESTEROL EN LA DIETA
SOBRE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA Y FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA LIPOGENESIS Y OXIDACION DE
ACIDOS GRASOS**

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Nutrición

Presenta:

Nara Elizabeth Lara Pompa

Dirigido por:

Dra. Nimbe Torres y Torres (externo)
Departamento de Fisiología de la Nutrición,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Dr. Elhadi Yahia Kazuz (interno)
Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)

SINODALES

Dra. Nimbe Torres y Torres
Presidente


Firma

Dr. Elhadi Yahia Kazuz
Secretario

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Vocal


Firma

M en C Diana Beatriz Rangel Peniche
Suplente


Firma

M. en C. Ma. De los Ángeles Aguilera Barreiro
Suplente


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2010
México

RESUMEN

La resistencia a la insulina constituye la base de la Diabetes Mellitus, un problema importante de salud pública en México. Estudios han demostrado una relación entre los ácidos grasos de la dieta, el metabolismo de lípidos hepáticos y alteraciones en la señalización de insulina. No obstante, pocas investigaciones han observado estas interacciones a corto plazo y durante el postprandio. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto agudo de distintos tipos de ácidos grasos (saturados y poliinsaturados) y la presencia de colesterol en la dieta sobre la expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de insulina (IRS-1, JNK y TNF α) y factores involucrados en la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en hígado (PGC-1, SREBP-1c, PPAR α , FAS, CPT-1). Se alimentaron 20 ratas Sprague-Dawley macho con una dieta con 5% de aceite de soya (dieta control) durante una semana para adaptarlas al horario restringido. El día del estudio se dividieron en 4 grupos y se les alimentó con la dieta control o una dieta alta en grasa con 20% de aceite de coco como fuente de ácidos grasos saturados (AGS) o 20% de aceite de soya como fuente de ácidos grasos poliinsaturados (AGI), con o sin colesterol, durante 2 horas previas a la eutanasia. Se determinaron parámetros bioquímicos y lípidos en suero, así como expresión de genes y proteínas hepáticas. Los resultados mostraron que el consumo agudo de una dieta alta en grasa incrementa la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en hígado vía PGC-1 β independiente del tipo de ácido graso, viéndose inhibida con el consumo de colesterol en conjunto con una dieta alta en AGI. Una dieta alta en AGI incrementa la expresión de PPAR α , CPT-1 y consecuentemente la oxidación de ácidos grasos, mientras que disminuye la expresión de genes lipogénicos hepáticos (SREBP-1c y FAS). Por el contrario, una dieta alta en AGS incrementa la lipogénesis y disminuye la oxidación de ácidos grasos. Asimismo, una dieta alta en AGS y colesterol disminuye la activación de IRS-1 (pIRS-1 Ser³⁰⁷) vía JNK y TNF α , mientras que una dieta alta en AGI incrementa la actividad de IRS-1 (pIRS-1 Tyr⁹⁴¹) y por lo tanto la señalización de insulina. En conclusión, el consumo agudo de una dieta alta en grasa incrementa la lipogénesis y oxidación hepática, mientras que el tipo de ácido graso y colesterol modulan la activación preferente de alguna de estas vías, modificando así los niveles de lípidos en sangre y la señalización de la insulina en hígado.

Palabras clave: ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados, lipogénesis, oxidación, dieta alta en grasa, señalización de insulina

SUMMARY

Insulin resistance is considered the basis of Diabetes Mellitus, which constitutes a public health issue of great importance in Mexico. Several studies have established the link between dietary fatty acids, lipid metabolism and altered insulin signaling in the liver. Nevertheless, there are few studies who analyzed this effect during an acute consumption of a high fat diet. Thus, the objective of this study was to determine the acute effect of different types of fatty acids (saturated and polyunsaturated) and dietary cholesterol on the expression of proteins involved in the insulin signaling pathway (IRS-1, JNK y TNF α) and transcription factors of lipogenesis and fatty acid oxidation in the liver (PGC-1, SREBP-1c, PPAR α , FAS, CPT-1). A total of 20 male Sprague-Dawley rats were fed with a diet containing 5% fat from soybean oil (control diet) during a week of adaptation to restricted feeding. The day of the study, they were divided into 4 groups and were fed either the control diet, a high fat diet (20%) rich in saturated fatty acids (SFA) from coconut oil or polyunsaturated fatty acids (PUFAS) from soybean oil, with or without cholesterol 2 hours prior to euthanasia. Serum levels of biochemical parameters and serum lipids were determined along with protein and gene expression in liver tissue. The results show that the acute consumption of a high fat diet induces the expression of PGC-1 β independent of the type of fatty acid. However, cholesterol consumption along with a diet rich in PUFAS interfered with the increased expression of this cofactor. A diet rich in PUFAS from soybean oil increased fatty acid oxidation in the liver via PPAR α and CPT-1, while decreasing expression of SREBP-1c, FAS and thus lipogenesis. In contrast, a diet rich in SFA increased the lipogenic pathway and decreased the oxidation of fatty acids. Additionally, a diet rich in SFA and cholesterol decreased IRS-1 activation (pIRS-1 Ser³⁰⁷) likely through JNK and TNF α , while a diet rich in PUFAS increased IRS-1 activation (pIRS-1 Tyr⁹⁴¹) and thus insulin signaling. In conclusion, the acute consumption of a high fat diet increases both lipogenesis and oxidation, while the type of fatty acid and the presence of cholesterol modulate the activation of these pathways, altering serum lipid concentrations and insulin signaling in the liver.

Key words: polyunsaturated fatty acids, saturated fatty acids, lipogenesis, fatty acid oxidation, high fat diet, insulin signaling.

DEDICATORIAS

Al Dr. León Cintra McGlone[†]
Científico invaluable y persona excepcional

A mi familia
Por su inspiración, apoyo y cariño incondicional

AGRADECIMIENTOS

Dra. Nimbe Torres y Dr. Armando Tovar

por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis y por ayudarme a mirar la Nutrición de una manera distinta.

Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCNSZ

por su apoyo en la realización del protocolo, así como los conocimientos y momentos compartidos.

A la facultad de Ciencias Naturales, UAQ

por todo el apoyo en mi formación como Nutrióloga.

A mis maestros

por los conocimientos compartidos y su apoyo a lo largo de mi carrera.

Dra. Pilar Durán

por inspirarme el gusto por la investigación y la ciencia.

INDICE

Página

Resumen.....	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice	v
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras	ix
Índice de abreviaciones.....	xi
I. INTRODUCCION	1
Justificación	4
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
A. OBESIDAD Y DIABETES: alteración del metabolismo de glucosa y lípidos	5
B. LA INSULINA EN EL CONTROL DE LA GLUCOSA Y EL METABOLISMO	7
1. Cascada de señalización de insulina: receptor y proteínas efectoras	8
2. La insulina en el transporte de glucosa: de PI3-K a GLUT-4.....	10
3. La insulina en la regulación del metabolismo de macro nutrientes: fosforilación y transcripción	12
C. RESISTENCIA A LA INSULINA: glucosa, lípidos e inflamación	13
1. Alteraciones en la cascada de señalización de insulina	14
a) Sustrato del receptor de insulina (IRS-1).....	15
b) Función central de c-Jun-cinasa (JNK).....	18
c) Inflamación y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α)	19
D. LA INFLUENCIA DE LOS LIPIDOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA....	21
1. Los ácidos grasos en la resistencia a la insulina	21

a) Ácidos grasos saturados	23
b) Ácidos grasos poliinsaturados	24
2. El colesterol dietario en la resistencia a la insulina.....	25
E. DIETA ALTA EN GRASA Y METABOLISMO DE LÍPIDOS	26
1. Lipogénesis: SREBP-1c y FAS.....	26
2. Oxidación de ácidos grasos: PPAR α y CPT-1	28
3. Colesterol dietario en el metabolismo de lípidos	30
4. Función del coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC-1 β).....	31
Hipótesis	34
Objetivos.....	35
III. MATERIALES Y METODOS.....	36
A. Diseño del estudio	36
1. Composición de la dieta	38
B. Grupos de estudio	39
1. Selección de la muestra	39
C. Métodos de estudio	40
1. Medición de peso corporal.....	40
2. Medición del consumo de alimento	40
3. Obtención de muestras de suero y tejido hepático.....	40
4. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales.....	41
5. Determinación de proteínas por la técnica de Western Blot.....	41
3. Determinación de mRNA por RT-PCR tiempo real.....	42
D. Análisis estadístico	43
IV. RESULTADOS.....	44
A. Ganancia de peso y consumo de alimento	44
B. Parámetros bioquímicos y hormonales: glucosa, insulina y glucagon	47
C. Colesterol y triglicéridos en suero	49

D. Expresión de genes lipogénicos hepáticos: PGC-1 β , SREBP-1c y FAS	51
E. Expresión de genes oxidativos hepáticos: PGC-1 α , PPAR α y CPT-1	54
F. Proteínas del metabolismo de lípidos en hígado	56
G. Proteínas de la cascada de señalización de insulina.....	58
H. Proteínas relacionadas con la inhibición de la señalización de insulina	60
V. DISCUSION	64
A. Dieta alta en grasa y metabolismo de lípidos: función central de PGC-1 β	64
B. Señalización de insulina con dietas altas en grasa: efecto del tipo de ácido graso y colesterol	67
LITERATURA CITADA	71
ANEXOS	78
I. Medición de glucosa en suero	79
II. Medición de insulina en suero por RIA Kit.....	79
III. Medición de glucagón en suero.....	80
IV. Medición de triglicéridos en suero	81
V. Medición de colesterol en suero	81
VI. Extracción de proteína con Buffer de lisis RIPA y cuantificación	82
VII. Western Blot.....	83
VII.1. Preparación de geles para Western Blot	85
VII. 2. Soluciones para Western Blot	86
VII.3. Condiciones para Western Blot	88
VII.4. SNAP	89
VIII. Extracción de RNA con Tiocianato de Guanidina y Cloruro de Cesio	90
VIII. 1. Reactivos para extracción de RNA.....	91
IX. Cuantificación de RNA.....	92
IX. 1. Reactivos para cuantificación de RNA	92
X. Electroforesis de RNA	93
XI. RT por MMuLV	94
XII. PCR tiempo real por Taq DNA polimerasa	95

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
2.1. Efecto de la insulina en la regulación de la glucosa en diversos tejidos.....	7
3.1. Composición de las dietas experimentales.	38
3.2. Grupos experimentales de acuerdo al esquema de dieta implementado 2 hrs previas a la eutanasia.	39
3.3. Proteínas hepáticas analizadas por Western Blot.	41
3.4. Genes analizados por RT-PCR tiempo real con sondas TaqMan	43

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1.	Resumen de los efectos de los ácidos grasos en la resistencia a la insulina y el metabolismo de lípidos. 3
2.1.	La resistencia a la insulina como factor central en el desarrollo de la obesidad y la DM. 6
2.2.	Interacciones del receptor de insulina con IRS-1/2. 8
2.3.	Dominios de acoplamiento al receptor de insulina de distintas proteínas efectoras. 9
2.4.	Reclutamiento de proteínas efectoras a IRS-1 después de su activación. 10
2.5.	Modelo de señalización para la translocación de GLUT-4 por IRS. 11
2.6.	Regulación del metabolismo postprandial por la cascada de señalización de Insulina. 13
2.7.	Principales acciones de IRS-1 y 2 en la cascada de señalización de insulina en el hígado. 16
2.8.	Alteración en la cascada de señalización de insulina por pIRS-1 Ser ³⁰⁷ mediada por JNK y TNF α 20
2.9.	Composición de ácidos grasos de varias grasas y aceites. 22
2.10.	Efecto de los ácidos grasos sobre la lipogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la señalización de insulina en hígado. 29
3.1.	Esquema del diseño general del estudio. 36
4.1.	Consumo de alimento (gr) por grupo experimental por día del estudio. 45
4.2.	Ganancia de peso (gr) por día del estudio. 46
4.3.	Concentraciones de glucosa, insulina y glucagon en suero de ratas. 48
4.4.	Concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero de ratas. 50

4.5.	Gel de integridad de RNA.....	51
4.6.	Expresión relativa de genes lipogénicos en hígado de ratas.....	53
4.7.	Expresión relativa de genes oxidativos en hígado de ratas.....	55
4.8.	Expresión relativa de proteínas del metabolismo de lípidos en hígado de ratas.....	57
4.9.	Expresión relativa de proteínas de la cascada de señalización de insulina en hígado de ratas.	59
4.10.	Expresión relativa de pIRS-1 Ser ³⁰⁷ y pIRS-1 Ser ³⁰⁷ /IRS-1 en hígado de ratas.....	61
4.11.	Expresión relativa de proteínas relacionadas con la inhibición de la señalización de insulina en hígado de ratas.	62
4.12.	Expresión relativa de TNF α en hígado de ratas.	63
5.1.	Efecto del consumo agudo de una dieta alta en grasa y el tipo de ácido graso que contiene sobre el metabolismo de lípidos en hígado.	66
5.2.	Alteración en la expresión de factores del metabolismo de lípidos y la señalización de insulina por el consumo de una dieta alta en grasa y el tipo de ácido graso.....	70

INDICE DE ABREVIACIONES

Akt	Proteína serina/treonina cinasa. También llamada PKB.
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa.
DM	Diabetes tipo 2 o Diabetes Mellitus.
FAS	Sintasa de ácidos grasos.
GLUT-4	Transportador de glucosa.
IR	Receptor de insulina.
IRS	Sustrato de receptor de Insulina. Su fosforilación en el sitio Tyr ⁹⁴¹ lo activa mientras que su fosforilación en Ser ³⁰⁷ lo inactiva.
JNK	c-Jun-cinasa.
PDK	Cinasa dependiente de PIP3.
PGC-1	Coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas.
PI3-K	Fosfatidil inositol 3 cinasa.
PKC	Proteína cinasa C.
PPAR α	Receptor activado de proliferación de peroxisomas.
RI	Resistencia a la insulina.
SREBP-1c	Proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides.
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa.

I. INTRODUCCION

Los nutrimentos son la fuente de energía del organismo. No obstante, en años recientes se ha incrementado su estudio como señales químicas que modulan la transcripción de diversos genes involucrados en el metabolismo. Tal es el caso de los ácidos grasos, cuyo estudio se ha centrado en la aparición de alteraciones relacionadas con enfermedades como la Diabetes y la obesidad. Considerando la importancia que ambas enfermedades tienen actualmente por su alta incidencia y comorbilidades, resulta de suma importancia conocer los mecanismos moleculares por los cuales ocurren las alteraciones que llevan a estas patologías y la función que los ácidos grasos tienen en ello.

Tanto la Diabetes como la obesidad tienen en común una condición denominada Resistencia a la Insulina (RI), la cual se refiere a la incapacidad de los tejidos a responder a los niveles circulantes de insulina. Esta hormona anabólica está relacionada con el control de la glucemia en sangre así como la regulación del metabolismo de macro nutrimentos. Para llevar a cabo sus efectos en las células, la insulina se une a su receptor en las membranas plasmáticas e inicia una cascada de señalización, es decir se activan una serie de factores, entre ellos el sustrato de receptor de insulina (IRS), para finalmente provocar la captación de glucosa hacia el interior de la célula y la activación de factores relacionados con la gluconeogénesis, glucogenólisis y lipogénesis, entre otros. Cuando ocurren alteraciones en los factores de la cascada de señalización, la insulina no puede llevar a cabo su función y aparece la RI. IRS tiene un papel importante en ello, puesto que contiene numerosos sitios de fosforilación (el más estudiado es pIRS-1 Ser³⁰⁷) que de estar activados pueden evitar que se una al receptor de insulina e iniciar la cascada. A su vez factores como c-Jun-cinasa (JNK) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α) están involucrados en la fosforilación de IRS-1, mecanismo que será estudiado en el presente trabajo.

Los ácidos grasos por su parte, son capaces de afectar la expresión y función de factores del metabolismo de manera directa o indirecta. De manera indirecta pueden propiciar la liberación de hormonas como la insulina, que a su vez activan genes. De forma directa se unen a factores de transcripción y activan la expresión de diversos genes, o bien alteran la función de estos factores mediante cambios post-transcripcionales. En el caso de la señalización de insulina, estudios han reportado que los ácidos grasos saturados activan TNF α , JNK y con ello pIRS-1 Ser³⁰⁷. Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ω -3, disminuyen tal activación y previenen así alteraciones en la señalización de insulina.

Cabe mencionar que los mismos lípidos dietarios son capaces de activar y modular la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos o en la oxidación de los mismos. Por ejemplo, los ácidos grasos saturados han mostrado incrementar la expresión de proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBP-1c) y la sintasa de ácidos grasos (FAS), factores involucrados en la lipogénesis. Por su lado, los ácidos grasos poliinsaturados han mostrado incrementar la actividad oxidativa por medio del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PPAR α) que a su vez activa la carnitil palmitoil transferasa (CPT-1) involucrada en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, una dieta alta en grasa ha mostrado activar al coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas beta (PGC-1 β), el cual está involucrado en la activación de ambas vías en el hígado. Estos efectos se muestran en la Figura 1.1.

Por ello, la cantidad y tipo de ácidos grasos consumidos en la dieta es de gran importancia en la modulación del metabolismo de lípidos y la señalización de insulina, procesos íntimamente relacionados con la RI, la Diabetes y la obesidad. De ahí la importancia de conocer a fondo los mecanismos por los cuales se dan estas alteraciones y poder elaborar recomendaciones para sugerir cambios en la dieta basados en evidencia. Con ello, sería posible prevenir o incluso revertir estas patologías, mejorando el estado de salud de las personas.

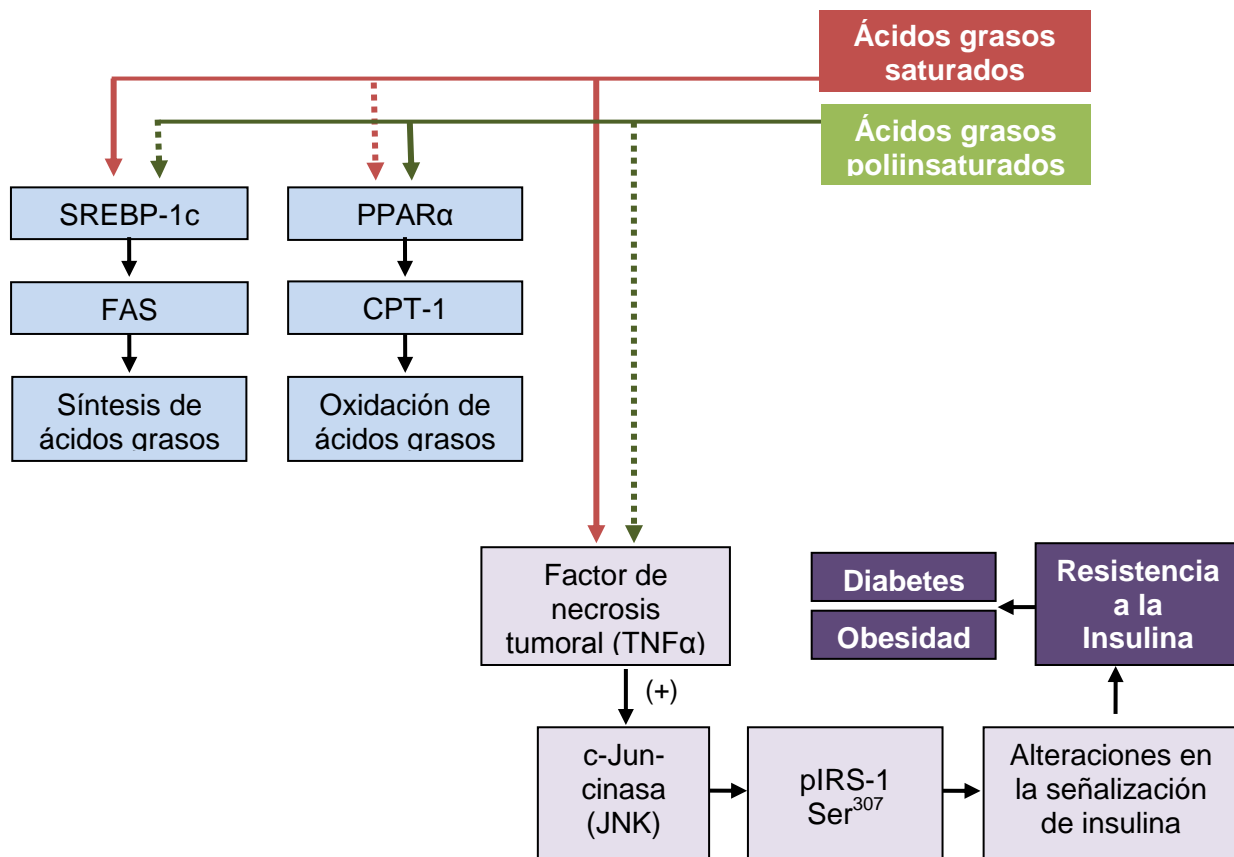


Figura 1.1. Resumen de los efectos de los ácidos grasos en la resistencia a la insulina y el metabolismo de lípidos. Línea punteada=inhibe, línea continua y (+)=activa.

JUSTIFICACIÓN

La diabetes y la obesidad son actualmente problemas preocupantes en México y en el resto del mundo debido a su alta incidencia y al impacto negativo que tienen sobre el estado de salud de las personas que las padecen. Para poder combatir estas patologías es de vital importancia comprender el efecto que los estilos de vida, especialmente la dieta, tienen sobre la aparición de éstas.

En años recientes, el campo de la nutrición ha comenzado a estudiar cómo los nutrimentos de la dieta son capaces de modular distintas vías metabólicas mediante cambios transcripcionales o post-transcripcionales de factores, predisponiendo así la aparición de alteraciones metabólicas o bien previniendo su aparición. Estudios han mostrado que la cantidad y tipo de ácidos grasos consumidos en la dieta son claves para la modulación del metabolismo de lípidos y la señalización de insulina, procesos íntimamente relacionados con la aparición de RI, diabetes y obesidad. De ahí la importancia de conocer a fondo los mecanismos por los cuales se dan estas alteraciones, para poder finalmente elaborar recomendaciones nutricias basadas en evidencia. Con ello, sería posible prevenir o tratar estas patologías mediante cambios en la dieta, mejorando así el estado de salud y calidad de vida de las personas que las padecen.

A pesar de contar con diversos estudios que analizan estos mecanismos de manera crónica, pocos han analizado el efecto durante el postprandio, es decir después de consumir un alimento, y más aún de manera aguda. Resulta interesante por ello, evaluar los mecanismos adaptativos que el organismo lleva a cabo para lidiar con un exceso de ácidos grasos provenientes de la dieta durante el postprandio y con un consumo a corto plazo, así como el efecto que en ello tiene el consumo de colesterol en la dieta. Esto contribuiría a completar el panorama de los cambios metabólicos que los lípidos dietarios tienen en el organismo para poder atacar estas patologías y alteraciones de manera efectiva.

II. REVISION DE LITERATURA

El cuerpo humano requiere de diversos nutrimentos para poder funcionar correctamente. Los nutrimentos, no obstante, tienen múltiples funciones en el organismo además de proveer energía. En años recientes se ha estudiado cómo los nutrimentos pueden actuar como señales químicas en el organismo y activar la expresión de genes de enzimas y factores relacionados con el metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Conociendo los mecanismos de acción que los alimentos y sus compuestos bioactivos tienen a nivel molecular, es posible hacer recomendaciones específicas para tratar y normalizar alteraciones metabólicas por medio de la dieta. A este estudio se le denomina Nutrigenómica (Torres, 2010).

Varios nutrimentos se han estudiado por sus propiedades de modificar la transcripción de genes, entre ellos los ácidos grasos. Su estudio no sólo se ha centrado en conocer las modificaciones metabólicas que se llevan a cabo en condiciones normales, sino en procesos patológicos. Esto con el fin de poder prevenir o revertir las alteraciones metabólicas que ocurren en enfermedades como la obesidad y la diabetes (Torres, 2010).

A. OBESIDAD Y DIABETES: alteración del metabolismo de glucosa y lípidos

La Diabetes Mellitus (DM) y la obesidad son patologías que han sido estudiadas con especial interés en años recientes por su alta prevalencia a nivel mundial, así como sus comorbilidades asociadas. Ambas patologías son consideradas actualmente uno de los mayores problemas de salud pública en México (Olaiz-Fernández et al., 2007; Córdova et al., 2008). A nivel mundial, la OMS estima que para el 2030 se tendrán 366 millones de personas con DM, y en México se estima una prevalencia del 12.3% para el 2025, con una tasa de mortalidad en aumento (Olaiz-Fernández et al., 2007).

La DM es una enfermedad crónica caracterizada por una alteración en el control de la glucemia en sangre, que es causa de diversas comorbilidades que no sólo disminuyen la calidad de vida de aquellos que las sufren, sino que representan un gasto enorme para el sistema de salud (Olaiz-Fernández et al., 2007). De aquí la necesidad de conocer los factores que llevan a su aparición y los mecanismos moleculares involucrados.

La relación entre ambas patologías, obesidad y DM, ha sido reconocida por varios años, al punto que la obesidad es considerada un factor de riesgo para la DM (González, 1999). Adicionalmente, otros factores de riesgo para la aparición de la DM, como lo son la hipertrigliceridemia y la hipertensión arterial, están presentes en la obesidad como lo muestra la Figura 2.1. (Olaiz-Fernández et al., 2007). Las personas obesas tienen aumento de peso, mayor acumulación de grasa en zonas abdominales y alteraciones de la presión y los lípidos sanguíneos. Es claro entonces que existe una relación muy cercana entre ambas patologías, no sólo a nivel epidemiológico sino a nivel fisiopatológico, teniendo como base la alteración del metabolismo de glucosa y lípidos, estado al que se denomina Resistencia a la Insulina (Saltiel y Pessin, 2002).



Figura 2.1. La resistencia a la insulina como factor en la obesidad y la DM.

B. LA INSULINA EN EL CONTROL DE LA GLUCOSA Y EL METABOLISMO

La concentración de glucosa en la sangre es regulada de manera muy precisa para evitar variaciones importantes durante los periodos de postprandio y ayuno. La concentración de glucosa depende de varios factores, entre ellos la síntesis y liberación de glucosa por el hígado, la utilización por parte de los tejidos periféricos y la entrada de glucosa a la circulación durante el postprandio (Saltiel y Kahn, 2001).

La insulina es una hormona anabólica clave en la regulación de las concentraciones de glucosa. Se produce en las células β del páncreas y es liberada en respuesta a niveles de glucosa y aminoácidos elevados en sangre, tal y como ocurre durante el periodo de postprandio (Pessin y Saltiel, 2000). Esta hormona actúa después sobre varios tejidos para asegurar que los niveles de glucosa se mantengan estables, como se observa en el Cuadro 2.1. (Goalstone y Draznin, 1997; Pessin y Saltiel, 2000; Saltiel y Kahn, 2001; Krentz, 2003).

Cuadro 2.1. Efecto de la insulina en la regulación de la glucosa en diversos tejidos.

TEJIDO	ACCIÓN	EFEECTO
Hígado	(-) gluconeogénesis y glucogenólisis	Disminuye la síntesis y liberación de glucosa a la sangre
Tejido adiposo y músculo	(+) captación y utilización de glucosa en las células	Disminuye las cantidades circulantes de glucosa

(-) inhibición, (+) estimulación.

No obstante, también se ha reportado que la insulina tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de los lípidos y proteínas. Estimula la síntesis de ácidos grasos mediante la expresión de genes de enzimas de la lipogénesis e incrementa la síntesis de proteína (Saltiel y Kahn, 2001; Torres, 2010).

Todos los efectos de la insulina son el resultado de una compleja cascada de señalización que ocurre a partir del momento en que la insulina se acopla con su receptor en la membrana de la célula (Pessin y Saltiel, 2000) y termina con la fosforilación de diversas proteínas, la translocación de receptores de glucosa (GLUT-4), así como la transcripción de diversos genes.

1. Cascada de señalización de insulina: receptor y proteínas efectoras

El receptor de insulina (IR) es un receptor transmembranal que proviene de la familia de receptores de tirosina cinasa (Saltiel y Pessin, 2002). Está compuesto por 2 subunidades α extracelulares y dos β intracelulares unidos por enlaces disulfuro (Goalstone y Draznin, 1997; Pessin y Saltiel, 2000; Krentz, 2003). La enzima tirosina cinasa se encuentra en la porción citoplasmática del receptor, en un dominio dentro de la subunidad β , mientras que la insulina se une al receptor en las subunidades α extracelulares (Paz et al., 1997), las cuales actúan sobre las subunidades β para inhibir la actividad de tirosina cinasa cuando la insulina no se encuentra unida (Figura 2.2) (Saltien y Kahn, 2001).

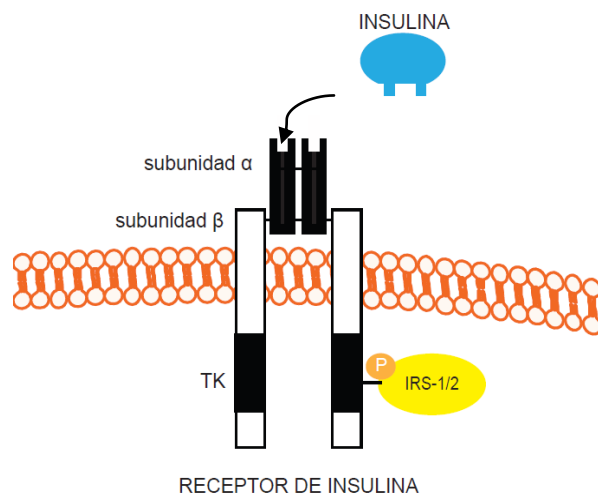


Figura 2.2. Interacciones del receptor de insulina con IRS-1/2. TK = dominio de tirosina cinasa.

La cantidad de receptores de insulina es mayor en tejidos como el hígado, tejido adiposo y músculo. Su regulación depende de varios factores como la cantidad de insulina. Cuando existen cantidades muy elevadas de insulina circulante (hiperinsulinemia), los receptores se internalizan y se degradan por endocitosis como un mecanismo de defensa (Krentz, 2003).

Una vez que la insulina se une al IR, el receptor experimenta un cambio de conformación que provoca que el efecto inhibitorio de la subunidad α sobre la β cese. Con ello, la subunidad β se activa y lleva a cabo fosforilaciones de residuos de tirosina encontrados en el mismo dominio, lo cual atrae a otras proteínas citoplasmáticas denominadas efectoras (Saltiel y Kahn, 2001; Krentz, 2003) que a su vez serán fosforiladas para ser activadas. Los aminoácidos contiguos al residuo de tirosina son responsables de la especificidad de la interacción entre las proteínas efectoras y el receptor activado (Goalstone y Draznin, 1997; Paz et al., 1997). Cabe mencionar que se ha propuesto que la fosforilación de distintos residuos de tirosina en el receptor dan como resultado las distintas funciones que la insulina tiene en los tejidos. Así, por ejemplo, la fosforilación del residuo $-COOH$ provoca acciones mitogénicas, otras ayudan a la unión de sustratos y otras más determinan la acción catalítica del receptor (Pessin y Saltiel, 2000).

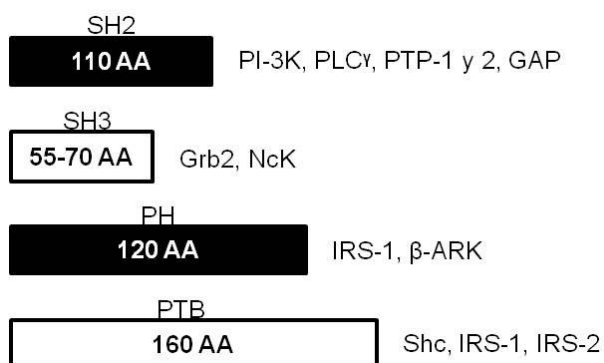


Figura 2.3. Dominios de acoplamiento al receptor de insulina de distintas proteínas efectoras.

Las principales proteínas efectoras del IR son el sustrato de receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1 y 2) (Krentz, 2003; Thirone et al., 2006; Dong et al., 2006). No obstante, se han identificado numerosas proteínas efectoras y la Figura 2.3 muestra los distintos dominios del receptor de insulina para algunas de ellas (Goalstone y Draznin, 1997).

Para activarse, IRS-1 y 2 se fosforilan en el residuo de tirosina 941 (pIRS-1 Tyr⁹⁴¹) una vez que entran en contacto con el domino activado del receptor de insulina y son responsables a su vez de activar a los siguientes intermediarios en la cascada de señalización como se muestra en la Figura 2.4 (Paz et al., 1997, Krentz, 2003; Boura-Halfon y Zick, 2009). Entre ellos destaca la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K), la cual es una enzima clave para la translocación final del receptor

de glucosa (GLUT-4) a la membrana celular, con lo cual se inicia el transporte de glucosa al interior de la célula en los tejidos periféricos como músculo y tejido adiposo (Figura 2.4.) (Goalstone y Draznin, 1997; Saltiel y Kahn, 2001). Cabe resaltar que cada proteína efectora no actúa de forma independiente a las demás, sino que existen interacciones entre ellas, de manera que existen varias rutas por medio de las cuales se puede activar la cascada de señalización. Además estudios *knockout* en ratas han mostrado que las funciones de IRS-1 e IRS-2 son complementarias y no redundantes (Saltiel y Kahn, 2001).

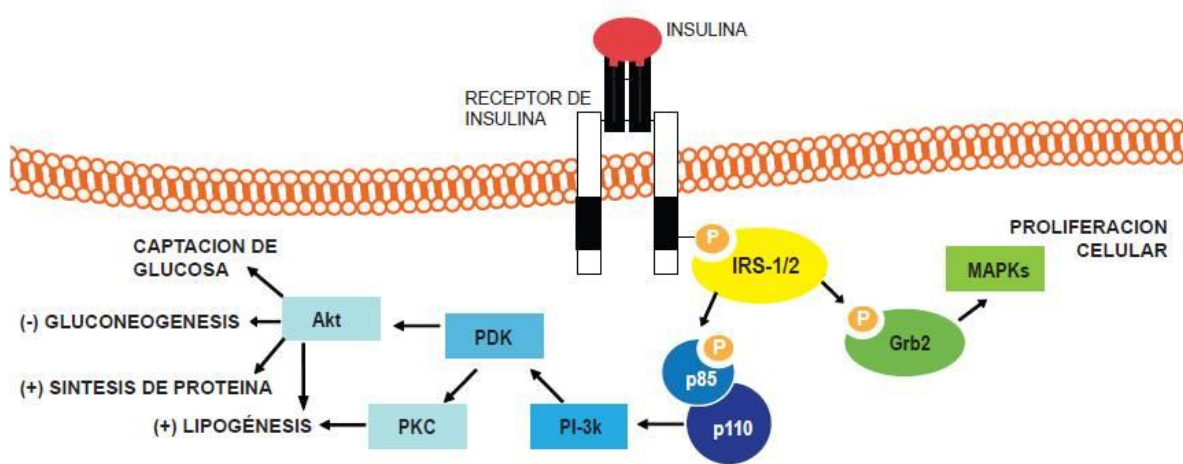


Figura 2.4. Reclutamiento de proteínas efectoras a IRS-1 después de su activación.

2. La insulina en el transporte de glucosa: de PI3-K a GLUT-4

Una de las funciones básicas de la insulina es la captación de glucosa por los tejidos periféricos, principalmente músculo y tejido adiposo. Una vez que PI3-K se activa, se continúa la cascada de señalización con dos moléculas: la proteína serina/treonina cinasa o Akt (también llamada PKB) y la proteína cinasa C (PKC). Ambas están relacionadas con la translocación de GLUT-4 en células musculares y adipocitos como se observa en la Figura 2.5. (Pessin y Saltiel, 2000).

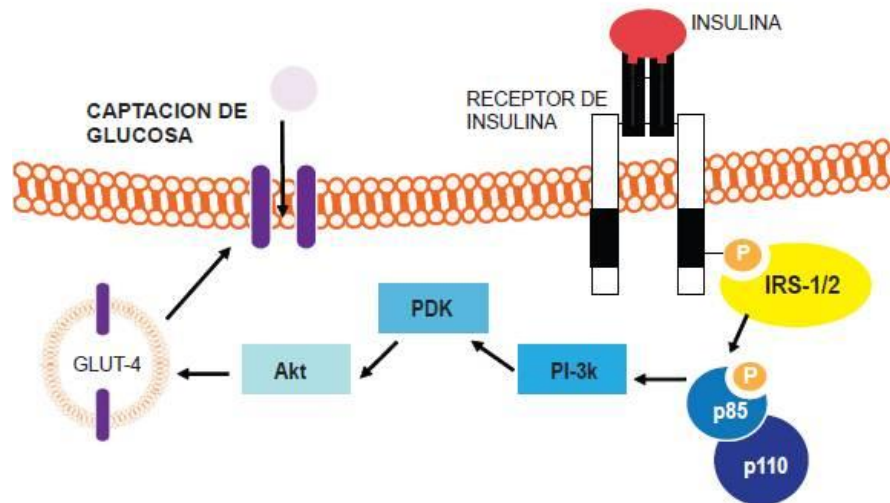


Figura 2.5. Modelo de señalización para la translocación de GLUT-4 por IRS.

Los mecanismos específicos involucrados en la translocación de las vesículas que contienen GLUT-4 desde el compartimento intracelular a la membrana plasmática siguen siendo controversiales. En un estado basal, estas vesículas están siendo recicladas entre el compartimento intracelular y la membrana. Sin embargo, con la activación de la cascada de señalización de insulina, se incrementa la translocación a la membrana y se disminuye la internalización (Saltiel y Pessin, 2002). La translocación involucra un proceso de exocitosis de las vesículas por medio de las proteínas VAMP 2 y 3 que interactúan con otras proteínas de la membrana (Pessin y Saltiel, 2000). Una vez que GLUT-4 se encuentra en la membrana, se puede iniciar la captación de glucosa sanguínea hacia el interior de la célula muscular o adipocito.

3. La insulina en la regulación del metabolismo de macronutrientos: fosforilación y transcripción

Además de la secuencia de señales que se llevan a cabo en los tejidos periféricos, principalmente tejido adiposo y músculo, para la captación de glucosa en respuesta a la insulina, ésta también lleva a cabo efectos a nivel de metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas por medio de la transcripción de genes en el hígado.

Durante el postprandio temprano, la insulina estimula la captación y almacenamiento de glucosa en hígado y músculo por medio de la activación de la enzima PI3-K, la cual activa a la cinasa Akt por medio de la cinasa dependiente de PIP3 (PDK) y da como consecuencia la transcripción de la sintasa de glucógeno (GSK3), enzima involucrada en la síntesis de glucógeno. A su vez, Akt fosforila a otro factor denominado FOXO para inhibir la transcripción de factores de la gluconeogénesis y glucogenólisis (Lizcano y Alessi, 2001; Dong et al., 2006; Guo et al., 2009).

Además, la insulina tiene la capacidad de influenciar el metabolismo de lípidos y proteínas en el hígado. Por su naturaleza anabólica, aumenta la captación de aminoácidos para la síntesis de proteínas, así como la síntesis de lípidos (Goalstone y Draznin, 1997; Saltiel y Kahn, 2001; Guo et al., 2009).

Conforme avanza el periodo de postprandio, la insulina vía IRS-1 y la vía de PI3-K→Akt propicia la transcripción de factores del metabolismo de lípidos como es el caso del factor de transcripción SREBP-1 para la síntesis de lípidos, el cual también puede ser activado por la proteína cinasa C (PKC), la cual se activa por IRS-2 (Dong et al., 2006; Guo et al., 2009; Li et al., 2009). De ésta manera, la insulina una vez unida a su receptor en las membranas celulares regula de manera importante el metabolismo durante el postprandio, como se observa en la Figura 2.6.

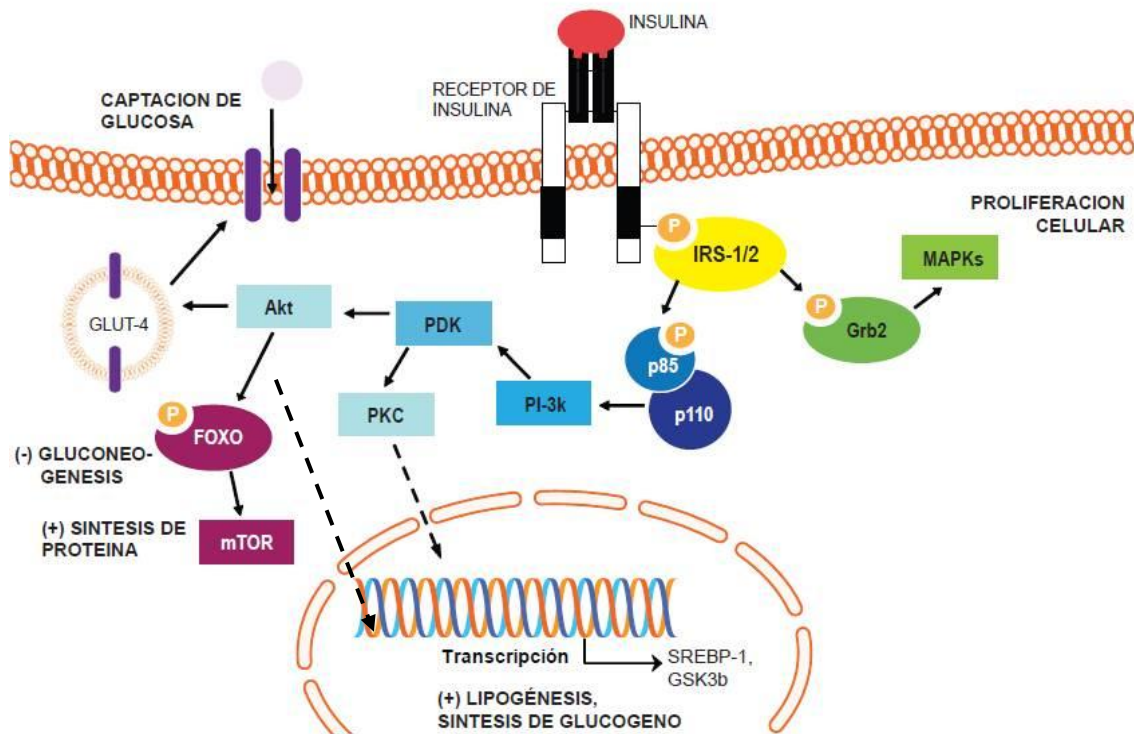


Figura 2.6. Regulación del metabolismo postprandial por la cascada de señalización de Insulina. Línea punteada = estimula transcripción.

C. RESISTENCIA A LA INSULINA: glucosa, lípidos e inflamación

Un desequilibrio en la función de la insulina resulta en una incapacidad de regular los niveles de glucosa sanguínea (Pessin y Saltiel, 2000; Saltiel y Kahn, 2001), ocasionando hiperglucemia e hipertrigliceridemia. A esta alteración se le conoce como resistencia a la insulina (RI) (Krentz, 2003).

La RI se define como el estado en el cual los tejidos son incapaces de responder a los niveles circulantes de esta hormona para captar la glucosa sanguínea y llevar a cabo la regulación del metabolismo normal de la insulina (Paz et al., 1997; Pessin y Saltiel, 2000; Krentz, 2003). Es decir, hay un fallo en la síntesis por las células β del páncreas y/o un fallo en respuesta del tejido periférico a la insulina en sangre (González, 1999; Thirone et al., 2006). Normalmente, la alteración comienza con la resistencia periférica a la insulina, por lo que el páncreas secreta más cantidad de esta hormona para compensarlo

(hiperinsulinemia). No obstante, eventualmente ocurre la falla en la secreción de insulina. A pesar de que la insulina pierde su capacidad de regular el metabolismo de hidratos de carbono, algunos estudios siguieron que mantiene su capacidad de síntesis de lípidos, por lo que se origina la hipertrigliceridemia característica de la RI (Li et al., 2009).

Dado que la insulina es la hormona encargada de introducir la glucosa a los tejidos, una alteración en la misma trae consigo un aumento en los niveles de glucosa en sangre que de forma crónica da lugar a la DM. Además, se ha observado un cuadro clínico de RI 10 a 20 años previo a la aparición de Diabetes (Shulman, 2000). Adicionalmente, la DM incluye alteraciones no sólo en los niveles de glucosa sino en el metabolismo de lípidos, lo cual también ocurre con la resistencia a la insulina (Saltiel y Kahn, 2001). La RI es por ello, la base de la aparición de la DM, o como algunos autores lo reportan, un estado de pre-Diabetes (Shulman, 2000; Krentz, 2003). Es además un estado considerado como una adaptación metabólica al incremento de peso y la obesidad (González, 1999; Obici y Rossetti, 2003). De aquí la importancia de saber las alteraciones que dan lugar a la RI.

1. Alteraciones en la cascada de señalización de insulina

Se ha mencionado que la RI es un estado de descompensación entre la insulina circulante y la capacidad de las células de responder a ella. Se ha observado a nivel fisiológico un incremento inicial en los niveles de insulina para tratar de compensar el incremento en glucosa. Esta hiperinsulinemia altera aún más la RI y finalmente se observa una disfunción en la producción de la misma (Storlien et al., 2000). Estudios recientes (White 2002) indican que esta disfunción puede deberse a descompensaciones de moléculas reguladoras más que un trabajo excesivo del páncreas que lleve al deterioro de las células β del páncreas. En otras palabras, la alteración en la cascada de señalización de la insulina es una pieza clave.

La alteración en la cascada de señalización de insulina que se reporta en la RI, puede ocurrir a diversos niveles y por distintas causas. Se han reportado alteraciones de tipo hereditarias en alguno o varios de los componentes de la cascada (Krentz, 2003).

a) Sustrato del receptor de insulina (IRS)

Diversos estudios han postulado la importancia crucial que alteraciones en IRS tienen en el desarrollo de la RI (White, 2002; Werner et al., 2004; Thirone et al., 2006). IRS contiene numerosos sitios de fosforilación (19% del total de la molécula) que modulan su actividad y actúan, como en el caso de la mayoría de los componentes de la cascada de insulina, para la regulación negativa de la misma cascada (Werner et al., 2004; Boura-Halfon y Zick, 2009).

Tanto IRS-1 como IRS-2 están involucrados de manera crucial en la cascada de señalización de insulina y ambos tienen una estructura muy similar, lo que ha dificultado separar sus funciones específicas. Estudios recientes se han enfocado en la función que ambos sustratos tienen en distintos tejidos y la importancia que cada uno tiene en el desarrollo de la resistencia a la insulina, es decir, tanto en la disfunción de las células β en el páncreas como en la resistencia periférica a la insulina (Thirone et al., 2006).

Inicialmente se reportó que IRS-1 actuaba de manera preferente en el tejido muscular y adiposo, e IRS-2 en el hepático (White 2002). No obstante, estudios posteriores han mostrado que IRS-1 tiene una importancia mayor en el control del metabolismo en el hígado, mientras que IRS-2 parece compensar la actividad de IRS-1 en este tejido (Thirone et al., 2006). Las funciones de ambos sustratos en la vía de señalización de insulina en hígado se muestran en la Figura 2.7.

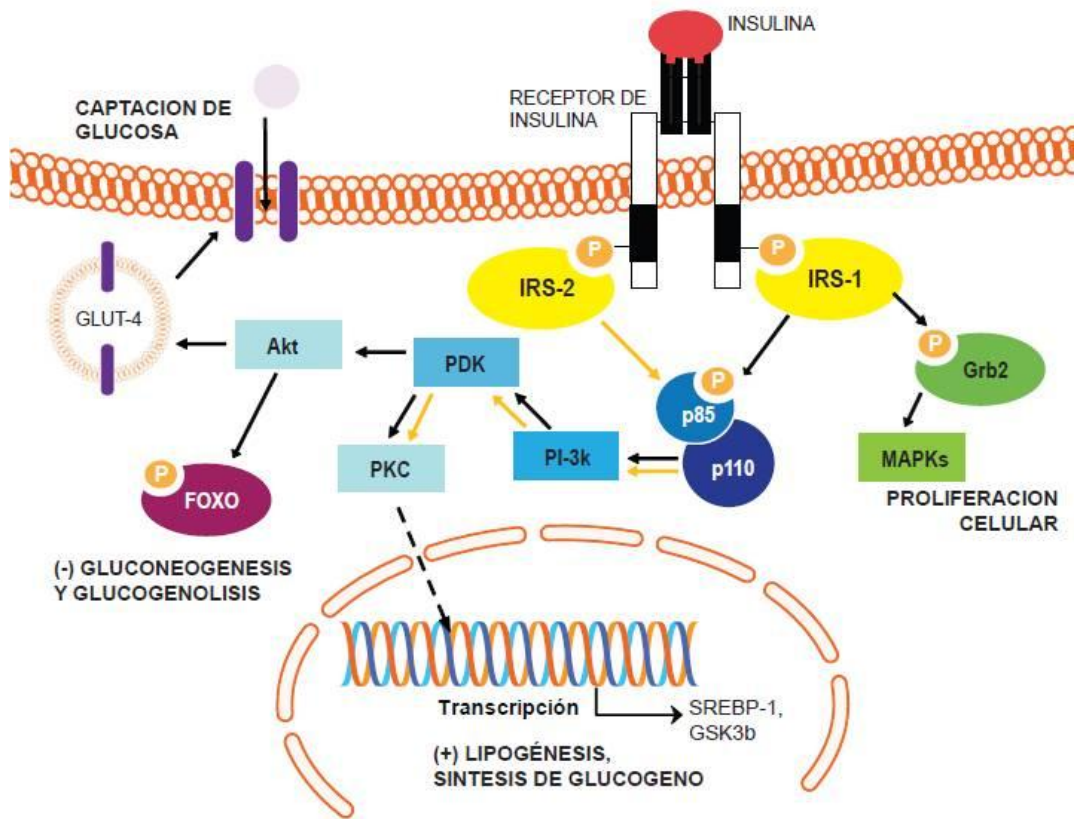


Figura 2.7. Principales acciones de IRS-1 y 2 en la cascada de señalización de insulina en el hígado.

En primer lugar, IRS-1 ha mostrado interactuar en mayor medida con Grb2 para la activación de la proliferación celular que IRS-2. Por otro lado, ratones *knockout* del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1^(-/-)) desarrollaron hiperinsulinemia y resistencia a la insulina y ratones IRS-2^(-/-) desarrollaron diabetes. Un estudio más exhaustivo mostró que la captación de glucosa por GLUT-4 en estos animales se encontraba reducida en tejido adiposo y músculo, lo cual contribuía de manera importante a los síntomas observados *in vivo* (Thirone et al., 2006). No obstante, en el hígado se encontró que la actividad de PI-3-K no se vio afectada en IRS-1^(-/-) debido a un efecto compensatorio en la secreción de insulina por las células β del páncreas mediado por IRS-2, por lo que ambos sustratos parecen cooperar para regular las funciones metabólicas de la insulina en el hígado (Dong et al., 2006; Thirone et al., 2006).

Cabe mencionar que un estudio llevado a cabo por Dong y colaboradores (2006) mostró que IRS-2 parece estar activado en periodos de ayuno, lo cual se cree sirve para contrarrestar los efectos del glucagon y adicionalmente contribuye a que el hígado lleve a cabo una respuesta más rápida a niveles incrementados de insulina como ocurre durante el postprandio (Kubota et al., 2008; Guo et al., 2009). Por otro lado, en periodos de exceso de nutrimentos, como ocurre con una dieta alta en grasa, IRS-2 se inhibe o degrada por acción de SREBP-1 (Dong et al., 2006), a diferencia de IRS-1 que se mantiene activado para seguir regulando el metabolismo de hidratos de carbono y contribuye al menos en parte al incremento en lipogénesis hepática por la hiperinsulinemia sostenida (Dong et al., 2006; Guo et al., 2009).

Teniendo en cuenta la importancia de IRS-1 en las alteraciones de la cascada de señalización de la insulina en el hígado durante el postprandio, especialmente en lo que concierne al metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, se han estudiado los distintos sitios de fosforilación que modulan de manera negativa su actividad.

Se sabe que la fosforilación de residuos de Ser/Tre ocasiona una disminución en la actividad de IRS-1 (Herschkovitz et al., 2007; Boura-Halfon y Zick, 2009), dependiendo del sitio de fosforilación. De esta manera se ha reportado que la fosforilación de un residuo de Ser en el dominio NH₂-terminal impide el acoplamiento de IRS-1 al receptor activado de insulina. Una fosforilación de un residuo de Ser/Tre en la región-COOH terminal, ocasiona la disociación de IRS-1 del IR y su degradación, mientras que una fosforilación en residuos de Ser en la misma región impide la unión de IRS-1 a sus proteínas efectoras de la cascada de señalización (Gual et al., 2005; Boura-Halfon y Zick, 2009).

Los principales sitios de fosforilación reportados son Ser-307, Ser-612, Ser-636, Ser-639, Ser-731 y Ser-789 (Saltiel y Kahn, 2001). De todos ellos, el primero es el más estudiado en relación alteraciones que ocurren en la resistencia

a la insulina (Thirone et al., 2006). La fosforilación a pIRS-1 Ser³⁰⁷ impide que el sustrato pueda acoplarse al receptor de insulina activado y fosforilarse a su forma activa (pIRS-1 Tyr⁹⁴¹) (Saltiel y Kahn, 2001; Werner et al., 2004; Thirone et al., 2006). Además se ha comprobado que se fosforila *in vivo* en modelos de resistencia a la insulina (Rui et al., 2001; Hirosumi et al., 2002).

Varias cinasas tienen la capacidad de fosforilar a IRS-1 y así regular de forma negativa su actividad. Estas enzimas se clasifican en 2: aquellas que son parte de la misma cascada de insulina y la regulan por retroalimentación negativa (por ejemplo MAPK, PKC y mTOR), y aquellas que son activadas por otras vías pero que inhiben la acción de la insulina, como por ejemplo AMPK y c-Jun-cinasa (JNK) (Aguirre et al., 2002; Werner et al., 2004; Boura-Halfon y Zick, 2009).

b) Función central de c-Jun-cinasa (JNK)

Desde hace algunos años, al estudiar la relación entre la obesidad y la diabetes tipo 2, se identificó a c-Jun-cinasa (JNK) como una enzima involucrada en la aparición de RI inducida por obesidad (Hirosumi et al., 2002). Su activación se presenta en modelos de obesidad hereditaria e inducida por dieta (Solinas et al., 2006). Un estudio llevado a cabo por Werner et al. (2004) mostró que tanto el residuo Ser³⁰⁷ como el Ser³⁰² de IRS-1 estaban involucrados en la RI mediante su fosforilación por JNK *in vivo* y la consiguiente alteración en el acoplamiento de IRS-1 con el IR (Aguirre et al., 2002). Cabe mencionar que esto sólo ocurre cuando ambos sitios son fosforilados en conjunto con otros más. Aunque IRS-1 pueda ser fosforilado por otras moléculas, la fosforilación en estos sitios en específico, no ocurre en los demás casos (ej. con GSK3, p38, MAPK, PKA y PKC). No obstante, dada la cantidad de cinasas que fosforilan residuos de Ser/Tre en las células humanas (aproximadamente 395), no se puede concluir que JNK es el único mecanismo por el cual se altera IRS-1 y consecuentemente se produce RI (Hirosumi et al., 2002; Boura-Halfon y Zick, 2009).

No obstante, JNK tiene un papel central en estas alteraciones, especialmente en el caso de modelos de obesidad inducida por dieta (Solinas et al., 2006). Estudios han mostrado que existe una mayor actividad de JNK en modelos de obesidad y diabetes tipo 2 (Hirosumi et al., 2002; Solinas et al. 2006) y que por el contrario, una menor actividad previene la RI inducida por obesidad. Así mismo, la inhibición de JNK por medio de fármacos inhibidores incrementa la sensibilidad a la insulina (Hirosumi et al., 2002). Todo esto apunta a que la inhibición de JNK parece estar ligada a la prevención de la RI.

Tomando en cuenta la gran variedad de cinasas y sitios de fosforilación en IRS-1, existen varios factores o señales que activan estas fosforilaciones, como es el caso de las citocinas pro inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral ($\text{TNF}\alpha$), los ácidos grasos libres y otras citocinas derivadas de adipocitos (Hirosumi et al., 2002; Schenk et al., 2008). Estos factores activan a las cinasas de IRS-1 para provocar la RI (Werner et al., 2004). Para el caso de JNK, se sabe que la insulina, los ácidos grasos libres como el ácido palmítico y $\text{TNF}\alpha$ son las señales que comúnmente lo activan para que a su vez propicie la fosforilación de pIRS-1 Ser³⁰⁷ (Boura-Halfon y Zick, 2009).

c) Infamación y Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$)

Por varios años se ha reconocido que existe una relación estrecha entre el proceso inflamatorio y la RI (White 2002), lo cual se ve reflejado en la relación entre obesidad (un estado inflamatorio) y la Diabetes (Hotamisligil, 1999). Varios estudios han mostrado que las citocinas inflamatorias, en especial el factor de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$), cumplen una función importante en la activación de cinasas que fosforilan residuos de serina en IRS-1 (Gual et al., 2005; Schenk et al., 2008), provocando así RI.

El factor de necrosis tumoral se ha relacionado especialmente con la activación de JNK, la cual es una cinasa que actúa en periodos de inflamación aguda o crónica (White 2002; Gual et al., 2005; Schenk et al., 2008). Dado que TNF α actúa en periodos de obesidad y trauma, este mecanismo podría explicar hasta cierto punto la aparición de RI en estos casos (Hotamisligil, 1999; White 2002).

La Figura 2.8. muestra el mecanismo por el cual esta citocina activa a JNK mediante fosforilación, la que a su vez fosforila a IRS-1 en Ser³⁰⁷ y afecta la capacidad de este sustrato de unirse al receptor de insulina, activarse (pIRS-1 Tyr⁹⁴¹) e iniciar la cascada de señalización (Hotamisligil et al., 1994; Gual et al., 2005). Consecuentemente, no se lleva a cabo la captación de glucosa, así como las demás regulaciones metabólicas que la Insulina lleva a cabo por esta vía (Gual et al., 2005).

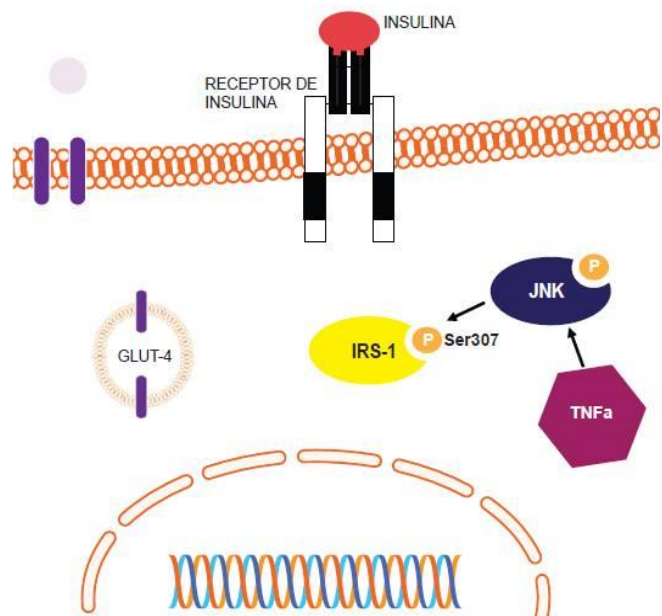


Figura 2.8. Alteración en la cascada de señalización de insulina por pIRS-1 Ser³⁰⁷ mediada por JNK y TNF α .

Adicionalmente, se ha planteado que puede haber una relación entre la disfunción de IRS-2 con la aparición de Diabetes tipo I, mediado por factores inflamatorios, especialmente TNF α e IL-1 β . Se cree que estos factores inflamatorios alteran la función de IRS-2 y provocan una disfunción de las células β del páncreas, por los mecanismos ya descritos para IRS-2 (White 2002). Esto altera aún más la función de la insulina y precipita la aparición de RI y diabetes.

D. LA INFLUENCIA DE LOS LIPIDOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Se sabe actualmente que existe una relación entre la dieta y la aparición de la resistencia a la insulina. De hecho se reconoce que la dieta y la actividad física son los factores de riesgo claves en la aparición de la DM. Estos estudios se han enfocado principalmente en la función que tienen los ácidos grasos de la dieta en la aparición de alteraciones en la cascada de insulina.

Tomando en cuenta la importancia de IRS, JNK y TNF α en las alteraciones en la cascada de señalización, es lógico pensar que los ácidos grasos actúan en estos factores para causar RI. De esta manera, los ácidos grasos de la dieta provocan cambios en la función de la insulina, dando paso a la RI con las consecuentes alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos, desembocando finalmente en la DM.

1. Los ácidos grasos en la resistencia a la insulina

Los ácidos grasos son los componentes principales de los lípidos dietarios. Son ácidos monocarboxílicos con una cadena larga de entre 8 y 22 átomos de carbono. Dependiendo de la presencia y cantidad de dobles enlaces en la cadena, se dividen en ácidos grasos saturados (ningún doble enlace), monoinsaturados (con 1 doble enlace) y poliinsaturados (2 o más dobles enlaces). Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados cabe mencionar al ω -3 y ω -6, los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben obtenerse de la dieta, siendo denominados ácidos grasos esenciales (Rodríguez et al., 2005).

Las grasas de la dieta contienen a éstos ácidos grasos en distintas proporciones. Los ácidos grasos saturados confieren a las grasas que los contienen en mayor proporción, como lo son la manteca, la mantequilla y el aceite de coco, una consistencia sólida a temperatura ambiente. Estas grasas son generalmente de origen animal. A su vez, los ácidos grasos insaturados se encuentran generalmente en mayor proporción en las grasas de origen vegetal

(aceites) y les confieren una consistencia líquida a temperatura ambiente (Rodríguez et al., 2005). Ambos tipos de ácidos grasos son reguladores metabólicos capaces de activar o inhibir la expresión de enzimas y factores que regulan el metabolismo. La Figura 2.9 muestra la composición de ácidos grasos de varias grasas y aceites, determinados en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) (datos no publicados), donde resalta el contenido de ácidos grasos saturados en el aceite de coco y los poliinsaturados en el aceite de soya.

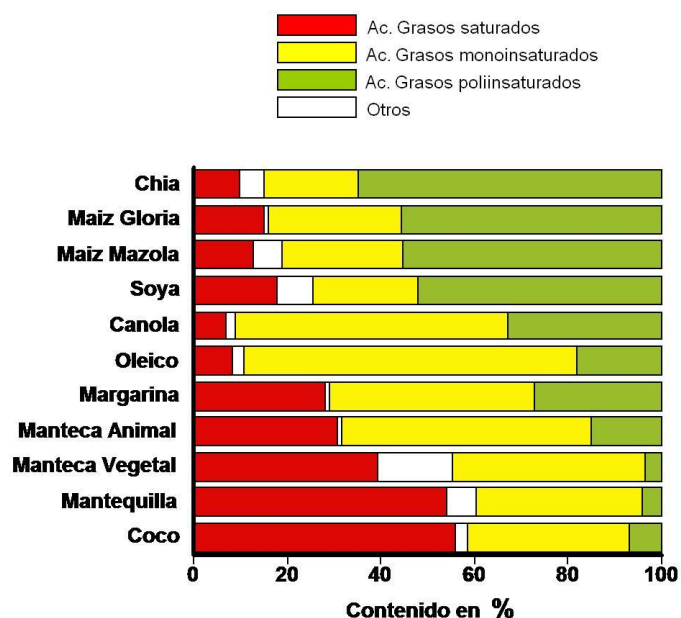


Figura 2.9. Composición de ácidos grasos de varias grasas y aceites.

Los nutrimentos como los ácidos grasos actúan de manera directa o indirecta para regular la expresión de genes (Storlien et al., 2000; Torres, 2010). De manera directa, los ácidos grasos se unen a factores de transcripción en el núcleo de las células y sirven como señales para iniciar la transcripción de ciertos genes. Estos factores de transcripción tienen la función de servir como sensores de nutrimentos, regulando la expresión de varias enzimas y factores conforme a las necesidades metabólicas del organismo (Torres, 2010). De manera indirecta, los nutrimentos como los ácidos grasos provocan cambios en hormonas, tales como la insulina, que a su vez activa distintas rutas de señalización que terminan con la activación o inhibición de la transcripción de genes (Storlien et al., 2000).

Los ácidos grasos, al igual que la glucosa y las proteínas, son capaces de provocar la liberación de insulina en el páncreas (Torres, 2010). Es por ello, que pueden llevar a cabo sus efectos por medio de la cascada de señalización de insulina, adicionalmente a los efectos que tienen de manera directa sobre diversos factores de transcripción.

a) Ácidos grasos saturados

Desde hace varios años se ha investigado el efecto que los ácidos grasos saturados tienen sobre la señalización de insulina. Estudios *in vitro* en la década de los ochenta, mostraron que cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana celular alteraban la unión de la insulina a su receptor, así como la acción del mismo; siendo que a mayor saturación del ácido graso, mayor la interferencia en la acción de esta hormona (Storlien et al., 2000).

Más tarde, estudios *in vivo* comprobaron que el consumo de ácidos grasos saturados provocaba una marcada resistencia a la insulina en diversos tejidos (Storlien et al., 2000). Al utilizar ácido palmítico, un ácido graso saturado, se identificó que éste activa de manera significativa a JNK, lo que desencadena la RI. Parte de esta inhibición se debe a la fosforilación de proteínas de la cascada, entre ellas IRS-1 y 2, lo que se traduce en una transcripción de insulina alterada (Solinas et al., 2006).

Otro estudio por Jaeschke y Davis (2007) mostró que el tratamiento *in vitro* con ácido palmítico incrementaba la expresión de JNK, dependiente de la dosis y el tiempo. Determinaron que la dosis necesaria para su activación se encontraba dentro de los límites fisiológicos normales y el periodo de tiempo que tardaba en activarse fue atribuido al hecho de que los ácidos grasos saturados pueden activar a JNK de forma indirecta, mediante el incremento en ceramidas y diacilglicerol (DAG). A su vez, la incubación con ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados no ocasionó un incremento en JNK.

Por su lado, un estudio por Nguyen et al. (2005) mostró que efectivamente los ácidos grasos saturados estimulaban la activación de JNK. No obstante, se estableció que aunque JNK era indispensable para los efectos de los ácidos grasos sobre la cascada de insulina, TNF α aunque importante no lo era. Lo anterior es acorde a observaciones de que JNK también puede ser activado por otras vías como la activación de PKC por ceramidas y DAG provenientes del metabolismo de ácidos grasos saturados (Nguyen et al., 2005; Jaeschke y Davis, 2007). Cabe mencionar que el incremento en ceramidas y DAG no se observa con la elevación de ácidos grasos a corto plazo (6hrs) (Serlie et al., 2007).

Finalmente, se sabe que los ácidos grasos saturados han mostrado favorecer una mayor secreción de insulina en el páncreas que los ácidos grasos insaturados (Stein et al., 1997). Puesto que la hiperinsulinemia puede ser una causa de RI mediante endocitosis de los receptores, este es un mecanismo más por el cual el tipo de ácido graso puede modular la señalización de insulina (Kahn y Flier, 2000; Storlien et al., 2000).

b) Ácidos grasos poliinsaturados

Un estudio que analizó el efecto de ácidos grasos ω -3 en la dieta de ratas (Ghafoorunissa et al., 2005), mostró que una dieta que proporcionó 2.6g/kg de estos ácidos grasos pudo prevenir la RI al incrementar la sensibilidad periférica a la insulina. Asimismo, se ha visto que los ácidos grasos ω -3 disminuyen la inflamación. Al disminuir TNF α , disminuye también la activación de JNK y la consiguiente alteración de la cascada de insulina (Todoric et al., 2006).

Otro mecanismo involucrado en la mejora de la señalización de insulina por los ácidos grasos poliinsaturados se refiere a la capacidad que tienen de modificar la composición y fluidez de la membrana, propiciando así una mejor unión del receptor de insulina con sus proteínas efectoras (Storlien et al., 2000).

Adicional al tipo de ácido graso, la cantidad de grasa en la dieta parece ser también un factor importante en las alteraciones en la cascada de insulina. Por ejemplo, a nivel de las células musculares, modelos que utilizaron dietas con grasa saturada y ω -6 poli insaturada a una concentración del 60% de las Kcal totales, encontraron a las 3 semanas que la señalización al nivel de IRS-1 y 2 se encontraba alterada, sin importar el tipo de ácido graso (Frangioudakis et al., 2005). Otro estudio llevado a cabo por Taouis et al. (2002), encontró que una dieta alta en grasa ω -3 o ω -6 (58% de la Kcal totales) causaba hiperglucemia, hiperinsulinemia, y alteraciones a nivel del IR e IRS-1 en el hígado. No obstante, se reportó que la sustitución de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados u ω -6 con ω -3 puede mejorar la respuesta a la insulina en dietas altas en grasa. Adicionalmente, es importante destacar que los estudios mencionados hasta este punto han evaluado el efecto de los ácidos grasos sobre la señalización de insulina en modelos de obesidad inducida por dieta o hereditaria y constituyen modelos para evaluar el efecto de los ácidos grasos de manera crónica.

2. El colesterol dietario en la resistencia a la insulina

El colesterol proveniente de la dieta también ha sido implicado en alteraciones en la cascada de insulina, principalmente mediante cambios en la composición de la membrana celular. Se ha identificado que en las membranas existen estructuras denominadas calveolas donde se concentran receptores, entre ellos el receptor de insulina y GLUT-4. Específicamente la caveolina-1, proteína encontrada en estas estructuras, puede interactuar con el receptor de insulina y favorecer la fosforilación de sus sustratos (González-Muñoz et al., 2009).

Un estudio llevado a cabo por Hahn-Obercyger et al. en el 2009, mostró que una dieta alta en colesterol (1%) por un periodo de 21 días era capaz de modificar la composición de estas estructuras y alterar la señalización de insulina, provocando una menor fosforilación de IRS-1 y Akt.

E. DIETA ALTA EN GRASA Y METABOLISMO DE LÍPIDOS

Adicionalmente a la capacidad que los ácidos grasos tienen para regular la expresión y fosforilación de los factores de la cascada de señalización de insulina, los ácidos grasos activan genes relacionados con el metabolismo de lípidos, como la lipogénesis y la oxidación, lo que a su vez tendrá un impacto sobre la misma señalización de insulina puesto que determinará la cantidad de lípidos circulantes e intracelulares que podrán alterar a los componentes de la cascada de insulina (Belfort et al., 2005).

1. Lipogénesis: SREBP-1c y FAS

Estudios han demostrado que los ácidos grasos son capaces de activar a factores relacionados con la síntesis de ácidos grasos o lipogénesis en hígado. Uno de los principales factores involucrados es SREBP (proteína que se une a los elementos regulatorios de esteroides), el cual regula genes relacionados con la biosíntesis y captura de colesterol y lípidos (Azzout-Marniche et al., 2000).

Este factor de transcripción se sintetiza a manera de precursor y se localiza anclado al retículo endoplásmico con los extremos –COOH y -NH₂ terminales hacia el citoplasma y el dominio central hacia el lumen del organelo (Krycer et al., 2010). Para llevar a cabo su función, este factor debe ser liberado por medio de 2 pasos proteolíticos para así ser capaz de entrar en el núcleo celular, donde lleva a cabo la transcripción de genes de enzimas como la sintasa de ácidos grasos (FAS), la acetil CoA carboxilasa y la proteína lipasa (Azzout-Marniche et al., 2000; Tovar et al., 2005). Al factor liberado se le denomina SREBP maduro y existen además 3 isoformas del factor: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. De manera general se reconoce que SREBP-1 está involucrado en la regulación de lípidos, mientras que SREBP-2 tiene un papel predominante en la regulación del colesterol (Knight et al., 2005; Tovar et al., 2005). Además SREBP-1c, a diferencia de las demás isoformas, se regula principalmente por cambios en el

estado nutricional, es decir, cambios en las concentraciones de insulina y otras hormonas (Eberlé et al., 2004).

Se ha demostrado que los ácidos grasos saturados incrementan la expresión de SREBP-1c, FAS y consecuentemente la lipogénesis en hígado de ratas (Vallim y Salter, 2010). Asimismo, el colesterol dietario incrementa la síntesis y maduración de SREBP-1c en el hígado (Kim et al., 2002).

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados han mostrado disminuir la lipogénesis en hígado debido a que interfieren con la síntesis y liberación de SREBP-1 del retículo endoplásmico (Worgall et al., 1998; Clarke, 2000). Los primeros estudios realizados en 1969 con distintos tipos de grasas, mostraron que la suplementación de la dieta con ácidos grasos poliinsaturados provoca una disminución de la lipogénesis en hígado (Allmann & Gibson, 1969; Clarke, 2000). Desde entonces numerosos estudios han comprobado que los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente los ω -3 en comparación con los ω -6, tienen la capacidad de inhibir la lipogénesis y disminuir la liberación de triglicéridos (TG) hepáticos mediante la inhibición de SREBP-1 (Jump & Clarke, 1999; Clarke, 2000). No obstante, el consumo de una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados con colesterol al 2% reprime el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados sobre un factor llamado SCD-1 involucrado en la síntesis de ácidos monoinsaturados, incrementando los niveles de triglicéridos y colesterol en el hígado, mientras que la maduración de SREBP-1c continúa reprimida (Kim et al., 2002).

Asimismo, se ha reportado que la insulina es capaz de favorecer síntesis del precursor de SREBP-1, así como su maduración y translocación al núcleo (Azzout-Marniche et al., 2000; Naïmi et al., 2009; Krycer et al., 2010), por lo que los ácidos grasos pueden incrementar la actividad de SREBP-1 de manera indirecta al propiciar la liberación de insulina que ocurre en mayor medida con los ácidos grasos saturados (Stein et al., 1997). Lo anterior también explica las dislipidemias asociadas a la resistencia a la insulina en hígado, puesto que se ha

reportado que a pesar de que la hiperinsulinemia existente no tiene efecto sobre la captación de glucosa y su metabolismo, sí es efectiva en propiciar la actividad de SREBP-1c, provocando así una síntesis excesiva de lípidos e hipertrigliceridemia (Biddinger et al., 2008).

2. Oxidación de ácidos grasos: PPAR α y CPT-1

Los ácidos grasos poliinsaturados también han demostrado incrementar la oxidación de ácidos grasos en hígado mediado por PPAR (receptor activado de proliferación de peroxisomas), el cual es un factor de transcripción nuclear activado por ligandos (Clarke, 2000). Se han identificado varias isoformas, cuya abundancia y función difiere entre tejidos, siendo PPAR α el más abundante en hígado. A su vez, los ácidos grasos han sido identificados como los ligandos endógenos de este factor de transcripción, siendo los ácidos grasos mono y poliinsaturados de cadena larga los que se unen con mayor afinidad (Clarke, 2000; Obici y Rossetti, 2003; Lefebvre et al., 2006).

PPAR a su vez, propicia la transcripción de varias enzimas relacionadas con la biogénesis mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos. Entre ellas destaca la enzima carnitina palmitoil transferasa (CPT-1), la cual controla la entrada de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria y es el paso limitante para la oxidación de ácidos grasos (Obici y Rossetti, 2003; Lefebvre et al., 2006).

Los ácidos grasos poliinsaturados son por ello claves en la activación de PPAR y el metabolismo oxidativo. Efectivamente, cuando este factor fue clonado por primera vez en 1990 por Issemann y Green, brindó evidencia de que los ácidos grasos insaturados tenían efectos directos sobre la transcripción nuclear de genes, adicionalmente a las modificaciones en la composición de membrana plasmática y la secreción de hormonas, para así propiciar la oxidación de ácidos grasos y la disminución de triglicéridos circulantes (Clarke, 2000).

Conjuntamente, este factor de transcripción tiene una relación estrecha con la inflamación, factor clave en alteraciones a la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la activación de PPAR α interfiere con la vía de inflamación y la expresión de TNF α en hígado (Choi et al., 2005; Lefebvre et al., 2006). De manera inversa, un incremento en TNF α inhibe de manera directa, y probablemente vía JNK, la transcripción de PPAR α (Kim et al., 2007), a la vez que incrementa a SREBP-1c, propiciando un aumento de los triglicéridos y con ello una mayor alteración de la insulina (Figura 2.10) (Beier et al., 1997; Endo et al., 2007).

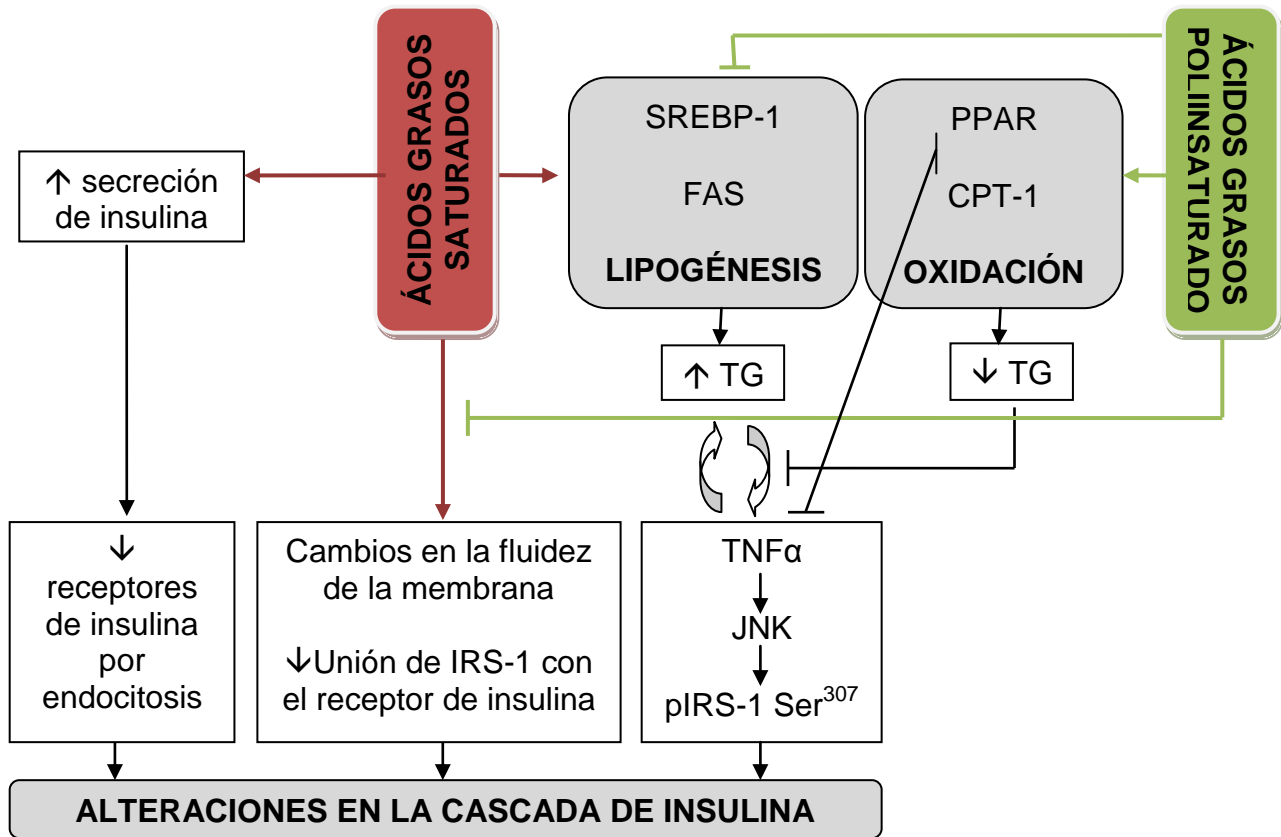


Figura 2.10. Efecto de los ácidos grasos sobre la lipogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la señalización de insulina en hígado.

Es importante mencionar que se ha correlacionado un aumento en la cantidad de triglicéridos circulantes, incluso a niveles fisiológicos, con una mayor inhibición de IRS-1 y la cascada de señalización de insulina (Belfort et al., 2005; Solinas et al., 2006). Teniendo esta asociación en cuenta, los ácidos grasos saturados, al favorecer la síntesis *de novo* y aumento de triglicéridos, provocan también alteraciones en la señalización de insulina, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados tienen el efecto contrario mediante la activación de PPAR α (Pettinelli et al., 2009). De esta manera, los ácidos grasos poliinsaturados (especialmente los ω -3) incrementan la oxidación de ácidos grasos, disminuyen los triglicéridos intracelulares, disminuyen citocinas inflamatorias y mejoran la fluidez de la membrana, con lo cual mejoran la sensibilidad a la insulina como se observa en la Figura 2.10 (Clarke, 2000).

3. Colesterol dietario en el metabolismo de lípidos

Adicional a los cambios en la membrana, el colesterol de la dieta puede influenciar la señalización de insulina al modificar el metabolismo de lípidos. Una dieta alta en colesterol (0.5% o 1%) incrementa los niveles séricos y hepáticos de colesterol y TG, debido a un aumento en la lipogénesis y una menor oxidación de TG como fue reportado por Liu et al. (1995) y Xu et al., (2004) independiente del tiempo de consumo (3, 7 y 21 días) (Fungwe et al., 1994). De hecho, el colesterol ha mostrado estimular la expresión de SREBP-1c y factores de inflamación, lo cual contribuye a la RI (Kim et al., 2002).

Por el contrario, Wang et al., (2010) reportaron que el consumo de 1% de colesterol en una dieta con contenido normal de lípidos disminuía tanto la lipogénesis (medido por expresión de FAS) como la oxidación de ácidos grasos (medida por CPT-1), propiciando la acumulación de TG en el hígado y una menor concentración en suero. Las diferencias en las concentraciones de TG en suero reportadas por otros estudios se lo han atribuido a la cantidad de grasa de la dieta, así como al tipo de grasa utilizada.

Mientras que dietas altas en grasa saturada y colesterol propician un incremento de peso, RI e hiperlipidemia (Basciano et al., 2009), las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados con colesterol muestran una menor maduración de SREBP-1c mas no de su precursor, mostrando que los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados predominan sobre los del colesterol en este punto (Kim et al., 2002).

Un estudio por Basciano et al. (2009) mostró un incremento en los niveles de insulina con el tiempo y la concentración de colesterol en la dieta, a la vez que no hubo diferencias en las concentraciones de glucosa, indicando la presencia de alteraciones en la señalización de insulina. Los niveles de colesterol y TG en suero e hígado se incrementaron de acuerdo con la concentración de colesterol en la dieta, con un aumento en la producción de TG por SREBP-1c y SCD-1. Se cree que este aumento es mediado por activación de LXR, el cual es un sensor de colesterol en la célula. También se reportó un aumento en PPAR y CPT-1, probablemente para compensar el exceso en el aporte de lípidos.

4. Función del coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC-1)

Se reconoce que los cofactores tienen un papel muy importante en la regulación de la actividad de factores de transcripción y receptores nucleares. Tal es el caso del coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC-1), el cual como se expone a continuación, tiene una importancia fundamental en el control del metabolismo de glucosa y lípidos en hígado.

El primer coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas identificado fue PGC-1 α . Este coactivador ha sido ampliamente estudiado desde entonces por su capacidad de incrementar la β oxidación (vía PPAR) así como la biogénesis mitocondrial y la gluconeogénesis en hígado (Sonoda et al., 2007). Sus niveles de aumentan en respuesta a señales

hormonales principalmente, como ocurre durante el ayuno, mientras que disminuye en respuesta al consumo de alimento (Lin et al., 2003 y 2005a). También se ha identificado que sujetos con DM tienen niveles elevados de este cofactor, probablemente por la desregulación del eje glucagon-insulina, y esto puede ser una pieza clave por la cual se elevan las concentraciones de glucosa en estos pacientes (Lin et al., 2005b). La elevación en gluconeogénesis se lleva a cabo por la coactivación de FOXO1 y HNF4 α por PGC-1 α (Herzig et al., 2001; Yoon et al., 2001; Lin et al., 2003).

PGC-1 β por su parte, es un coactivador descubierto hasta hace sólo unos años (Lin et al., 2002). Posee una estructura muy similar a PGC-1 α , además de tener una distribución muy similar, encontrándose en mayor medida en tejidos oxidativos como el corazón, músculo y tejido adiposo pardo (Sonoda et al., 2007). No obstante, se ha comprobado que este cofactor se regula de manera distinta, principalmente en periodos de postprandio y por acción de los nutrimentos (Lin et al., 2003). Al igual que PGC-1 α , PGC-1 β activa el metabolismo oxidativo y genes de la función mitocondrial vía PPAR α y Foxa2 en hígado (Sonoda et al., 2007; Vianna et al., 2006). Sin embargo, a diferencia de PGC-1 α , este coactivador no activa genes gluconeogénicos, puesto que su estructura no le permite asociarse y coactivar receptores nucleares como lo es HNF4 α (Lin et al., 2003 y 2005a).

Por otro lado, un estudio por Lin et al. (2005b) demostró que el consumo de una dieta alta en grasa incrementa la expresión de este cofactor en el hígado, el cual a su vez incrementa SREBP-1c por un dominio no presente en PGC-1 α . Más aún, se demostró que PGC-1 β es necesario para la activación de SREBP-1c y la consiguiente expresión de genes lipogénicos como FAS. A pesar de ello, la activación de este cofactor no provoca la acumulación de lípidos en hígado, puesto que también activa a LXR, un receptor nuclear de hormonas nuclear involucrado en el transporte de lípidos hepáticos. Este receptor activa el transporte de lipoproteínas, incrementando así los niveles de triglicéridos y VLDL en suero (Feige y Auwerx, 2007).

Estas observaciones también han sido apoyadas por un estudio de Sonoda et al. (2007) en el que ratones *knockout* de PGC-1 β ocasionaron esteatosis hepática con el consumo de una dieta alta en grasa. Lo anterior sugiere que PGC-1 β es especialmente importante para metabolizar las cargas elevadas de lípidos que ocurren con el consumo de una dieta alta en grasa, activando la lipogénesis, el transporte de lipoproteínas y la oxidación, previniendo así la acumulación de lípidos en hígado.

Adicionalmente, la expresión de esta proteína mutada (Vianna et al., 2006) demostró que una disminución en la actividad de PGC-1 β ocasiona una menor actividad de la insulina en hígado, poniendo en evidencia el vínculo entre el metabolismo de lípidos y la señalización de insulina. Se cree que mediante la activación de PPAR α , PGC-1 β es capaz de disminuir las concentraciones de lípidos intrahepáticos y con ello prevenir la inhibición de la cascada de insulina (Nagai et al., 2009). No obstante, un estudio por Nagai et al. (2009) reportó que la activación de PGC-1 β con una dieta alta en fructosa y grasa de manera crónica ocasionó alteraciones contrarias en la señalización de la insulina al incrementar la lipogénesis hepática mediada por SREBP-1c. Lin et al. (2005b) sugieren que este efecto de PGC-1 β *per se* puede no ser el causante de las alteraciones a la función de la insulina, sino que las alteraciones ya presentes aumentan su expresión, lo que de manera crónica ocasiona mayores niveles de lípidos por activación de SREBP-1c.

De esta manera, PGC-1 β ha sido reconocido como un cofactor importante durante el consumo de una dieta alta en grasa, situación en la que incrementa el metabolismo oxidativo, la lipogénesis y la secreción de lipoproteínas mediado por SREBP-1c y LXR y previniendo así la acumulación de lípidos en hígado y las alteraciones en la acción de la insulina en hígado (Lin et al., 2005a y b; Feige y Auwerx, 2007; Sonoda et al., 2007).

HIPÓTESIS

El consumo de una dieta alta en colesterol y ácidos grasos saturados (AGS) provenientes del aceite de coco incrementará la lipogénesis hepática mediada por PGC-1 β , SREBP-1c y FAS, a la vez que disminuirá la oxidación hepática mediada por PPAR α y CPT-1. Esto tendrá como consecuencia una mayor cantidad de triglicéridos y colesterol en suero y una alteración en la señalización de insulina mediada por TNF α y pJNK. A su vez, el consumo de una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados (AGI) provenientes del aceite de soya incrementará la oxidación de ácidos grasos en hígado e inhibirá la lipogénesis hepática mejorando así la señalización de insulina, efecto que se verá disminuido por la presencia de colesterol.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto agudo de distintos tipos de ácidos grasos (saturados y poliinsaturados) y la presencia de colesterol en la dieta sobre la expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina y factores de transcripción involucrados en la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en hígado de rata Sprague-Dawley.

Objetivos específicos

Determinar el efecto agudo que una dieta alta en ácidos grasos saturados o poliinsaturados y la presencia de colesterol tiene sobre:

1. Parámetros bioquímicos y hormonales en suero: glucosa, insulina, glucagon, colesterol y triglicéridos.
2. Expresión hepática de genes lipogénicos: SREBP-1c, FAS y el coactivador PGC-1 β .
3. Expresión hepática de genes oxidativos: PPAR α , CPT-1 y el coactivador PGC-1 α .
4. Expresión hepática de proteínas del metabolismo de lípidos: SREBP-1c, FAS y PPAR α .
5. Expresión hepática de proteínas de la vía de señalización de la insulina: IRS-1, pIRS-1 Tyr⁹⁴¹, pIRS-1 Ser³⁰⁷, JNK y pJNK.
6. Expresión hepática de la proteína del factor de necrosis tumoral (TNF α).

III. MATERIALES Y METODOS

A. Diseño del estudio

El proyecto consistió en un modelo experimental agudo en ratas Sprague-Dawley macho, mismo que se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

El diseño del estudio contempló evaluar el efecto del consumo agudo (2hrs previas a la eutanasia) de dietas altas en grasa (20%) ricas en ácidos grasos saturados o poliinsaturados, con o sin colesterol, sobre factores de la señalización de insulina y del metabolismo de lípidos en hígado durante el periodo de postprandio. La Figura 3.1 muestra el diseño general del estudio.



Figura 3.1. Esquema del diseño general del estudio

Previo al comienzo del estudio, se implementó un día de aclimatación al Bioterio con dieta Chow a libre demanda (*ad libitum*). Posteriormente, las ratas se alimentaron durante una semana con una dieta de requerimientos normales con 5% de grasa (dieta control) con el propósito de adaptarlas al consumo de alimento en horario restringido (de 9am a 2pm). Finalmente, en el día del estudio, se dividieron en 4 grupos de acuerdo a la dieta que consumirían 2 horas previas a la eutanasia. Las dietas experimentales fueron, como se muestra en la Figura 3.1, altas (20%) en ácidos grasos saturados provenientes del aceite de coco o bien ácidos grasos poliinsaturados provenientes del aceite de soya con y sin colesterol.

Para implementar el horario restringido, se retiró el comedero de las jaulas de las ratas a las 2 pm y se pesó y anotó el consumo de alimento de ese primer día. Los animales permanecieron en ayuno hasta el día siguiente a las 9am cuando se les volvió a introducir el comedero con la dieta control y se repitió el proceso de retirar los comederos a las 2 pm y anotar el consumo de la dieta. Con el periodo de adaptación de 7 días, las ratas aprendieron a consumir una cantidad de alimento similar a aquella de la dieta *ad libitum* pero en un tiempo delimitado durante el día. De esta manera se aseguró que al momento de la eutanasia (11am) hubieran ya consumido la dieta experimental.

Durante el estudio, las ratas se mantuvieron en el Bioterio del INCMNSZ con las siguientes condiciones:

- Jaulas de metal individuales
- Temperatura y humedad controladas: 18-21°C
- Ciclos de luz/oscuridad: 12hrs
- Acceso a agua: *ad libitum*
- Acceso a alimento: *ad libitum* el 1º día y restringido el resto del estudio

1. Composición de la dieta

Las dieta control aportó la cantidad normal recomendada de grasa (5%) proveniente de una fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados (aceite de soya) y un 20% de caseína como fuente de proteína, ajustado con base a la pureza de la misma. La composición nutrimental para ésta y las demás dietas experimentales se estableció en base a los requerimientos descritos en la recomendación AIN-93 para animales de laboratorio por el Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos (National Research Council) (Reeves et al., 1993).

Las dietas experimentales fueron altas en grasa (20%) y en algunos casos con colesterol al 0.5%. Para ello, se incrementó el contenido de grasa y se disminuyeron los niveles de dextrosa y almidón con respecto a la dieta control. La composición de las dietas experimentales y control se muestra en la Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Composición de las dietas experimentales.

DIETAS ¹	Control	AGS + colesterol	AGI + colesterol	AGI
	5% aceite soya	20% aceite coco 0.5% colesterol	20% aceite soya 0.5% colesterol	20% aceite soya
Vitaminas	1%	1%	1%	1%
Minerales	5%	5%	5%	5%
Colina	17%	17%	17%	17%
Dextrosa	34.41%	26.6%	26.6%	26.9%
Almidón	34.41%	26.6%	26.6%	26.9%
Proteína	20%	20%	20%	20%
Aceite coco	-	20%	-	-
Aceite soya	5%	-	20%	20%
Colesterol	-	0.5%	0.5%	-
Kcal/gr	4	4.72	4.72	4.72

¹ AGS = Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI = Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados. Las cantidades se reportan como % de gramos en la dieta.

B. Grupos de estudio

Para el desarrollo del proyecto, se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley macho con un peso de 100-124g provenientes de Harlan México S.A. de C.V, criadas en el laboratorio de producción de animales de laboratorio Centro UNAM-Harlan en la ciudad de México. Las mismas llegaron al Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) el 27 de agosto de 2008 y contaron con el certificado de salud de acuerdo a la normatividad vigente.

Las 20 ratas se dividieron en 4 grupos de 5 ratas cada uno de acuerdo a la dieta experimental que consumieron 2 horas previas a la eutanasia, tal y como se muestra en la Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Grupos experimentales de acuerdo al esquema de dieta implementado 2 hrs previas a la eutanasia.

GRUPO ¹	No. ratas	COMPOSICIÓN DE LA DIETA		
		Proteína	Ácidos grasos	Colesterol
Control	5	20% Caseína	5% aceite de soya	-
AGS + colesterol	5	20% Caseína	20% aceite de coco	0.5% colesterol
AGI + colesterol	5	20% Caseína	20% aceite de soya	0.5% colesterol
AGI	5	20% Caseína	20% aceite de soya	-

¹ AGS = Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI = Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados.

1. Selección de la muestra

- Criterios de inclusión: ratas Sprague-Dawley macho de 100-124g
- Criterios de exclusión: enfermas de apariencia o baja de peso sin explicación aparente y muerte durante el periodo del estudio

C. Métodos de estudio

A continuación se detallan los distintos métodos y técnicas utilizados durante el estudio experimental y el análisis de muestras. El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ.

1. Medición de peso corporal

Se registró el peso de las ratas todas las mañanas a la misma hora, previo al consumo de alimento, utilizando una báscula y registrando el peso en gramos.

2. Medición del consumo de alimento

Se calculó diariamente el consumo de alimento con base a la medición de los comederos por la mañana (antes de las 9am) y por la tarde (2pm), después de retirarlos de las jaulas. Se registró como gramos consumidos por rata en 5 horas de horario restringido.

3. Obtención de muestras de suero y tejido hepático

En el día de la eutanasia, se le colocó a cada rata el comedero con la dieta experimental o control de acuerdo al grupo al que pertenecían, y se retiró 2 horas después. En seguida, se trasladaron al Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ donde la eutanasia se realizó colocando los animales en una cámara saturada con CO₂ de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, inciso 9.4.1.3. y la posterior decapitación de acuerdo al inciso 9.5.3.3.

A continuación, se recolectó la sangre troncal en tubos con activador de coagulación y gel separador. Se mantuvieron en hielo hasta el momento de la separación del suero y se almacenaron a -20°C. Además se recolectaron muestras de hígado en tubos eppendorf de 1.5ml, manteniéndose en nitrógeno líquido al momento de la extracción y posteriormente congelándolas a -70°C hasta el momento de su análisis.

4. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales

Las concentraciones de glucosa sérica se analizaron por el método de glucosa oxidasa con el analizador YSI 2700 SELECT (ANEXO I). La concentración de insulina y glucagón se realizó con kits de radioinmunoensayo (Millipore). Los triglicéridos y el colesterol en sangre se determinaron mediante ensayos enzimático-colorimétricos con estuches de reactivos de diagnóstico in vitro (Bayer Corporation) (ANEXOS II a V).

5. Determinación de proteínas por la técnica de Western Blot

Para la determinación de proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y la señalización de insulina (Cuadro 3.3) mediante Western Blot, se extrajo la proteína del tejido hepático con Buffer de lisis RIPA con inhibidor de proteasas Complete (Roche Applied Science). Se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a 2°C y se recolectó el sobrenadante. Posteriormente se cuantificó cada muestra con Reactivo S mediante un espectrofotómetro (Beckman DU modelo 640), se formaron pools con las muestras de cada grupo a la concentración deseada (50, 100, 150 y 200µL) y se almacenaron a -70°C (ANEXO VI).

Cuadro 3.3. Proteínas hepáticas analizadas por Western Blot.

Metabolismo de lípidos	Señalización de insulina	Inflamación
<ul style="list-style-type: none">• SREBP-1c• FAS• PPARα	<ul style="list-style-type: none">• IRS-1• pIRS-1 Tyr⁹⁴¹• pIRS-1 Ser³⁰⁷• JNK• pJNK	<ul style="list-style-type: none">• TNFα

Para la determinación de las proteínas se utilizaron geles de acrilamida de 8-15% (ANEXO VII.1.) con un grosor de 1.5mm. Se cargó 12.5µL de la muestra y 12.5µL de Loading Buffer + β-mercapto a cada pozo y se corrió el gel 30 min a 75V y 2:30 hrs a 100V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) por electrotransferencia (9V por 1:30 h) y se bloquearon mediante la incubación con leche descremada al 5% o albúmina al 0.1%. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y una hora más a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:3500) por 1hr y las bandas se visualizaron con un reactivo químico luminiscente (Visualizer Spray and Glow, Santa Cruz) (ANEXO VII).

Las soluciones necesarias se pueden encontrar en el ANEXO VII.2., mientras que las condiciones específicas para la determinación de cada proteína se detallan en el ANEXO VII.3. En algunos casos se hizo uso del equipo SNAP (ANEXO VII.4) para bloquear e incubar las membranas con los anticuerpos.

6. Determinación de mRNA por RT-PCR tiempo real

La extracción de RNA total del tejido hepático se llevó a cabo por el método de Tiocianato de Guanidina y gradiente de Cloruro de Cesio (ANEXO VIII y VIII.1). Los tejidos almacenados a -70°C se colocaron en nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizados para así evitar la degradación del RNA. A su vez, la cuantificación de RNA se llevó a cabo con un espectrofotómetro (Beckman DU modelo 640) a 260 y 280nm en celdas de cuarzo (ANEXO IX). Para ello, se utilizaron 4 µl de Buffer TE por muestra (ANEXO IX.1).

A continuación se analizaron las muestras de mRNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar su integridad (ANEXO X). Una vez comprobada la integridad de todas las muestras, se analizaron por medio

de RT-PCR tiempo real (ANEXO XI) para determinar el contenido de mRNA hepático de los genes que se detallan en la Cuadro 3.4. Para ello se utilizaron ensayos fluorogénicos TaqMan (Applied Biosystems) y el equipo ABI prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, User Bulletin no.2). La concentración óptima de mRNA para cada gen a medir se determinó por medio de un rango dinámico de concentración de RNA. La reacción se llevó a cabo usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR Master Mix, AB), corriendo de forma paralela una reacción sin mRNA como control. Los valores de cada muestra por triplicado se normalizaron con el gen estructural 18s.

Cuadro 3.4. Genes analizados por RT-PCR tiempo real con sondas TaqMan.

	Nombre del gen	Tejido	No. Ensayo TaqMan
Genes lipogénicos	PGC-1 β	Hígado	Rn00598552_m1
	SREBP-1c	Hígado	SREBP1-SRE
	FAS	Hígado	Rn00569117_m1
Genes oxidativos	PGC-1 α	Hígado	Rn00580241_m1
	PPAR α	Hígado	Rn00566193_m1
	CPT-1	Hígado	Rn00580702_m1
Estructural	18s	Hígado	4310893E

D. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar del valor. Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) tomando como una diferencia significativa una $p < 0.05$. Cuando la relación resultó significativa, se realizó la prueba PLSD de Fisher. Para ello, se utilizó el programa estadístico Statview (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) para Macintosh.

IV. RESULTADOS

A. Ganancia de peso y consumo de alimento

Analizando los gramos consumidos por cada rata durante el estudio, el consumo promedio de alimento por día no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.1). La curva de consumo muestra cómo los gramos consumidos fueron incrementando a lo largo del estudio conforme las ratas se habituaban al horario restringido, llegando a consumir de 8 a 10g/día. Cabe mencionar que se esperaba que efectivamente no se encontraran diferencias significativas entre los grupos, puesto que todos consumieron la dieta control con los requerimientos normales de grasa y otros nutrimentos hasta el día de la eutanasia.

La Figura 4.1. muestra el consumo en el día de la eutanasia, por lo que este valor representa el alimento consumido durante tan sólo 2 horas, el cual fue en promedio de 5 a 7g. El mayor consumo se reportó en los grupos que consumieron una dieta rica en ácidos grasos saturados con colesterol (AGS + COL.) o poliinsaturados con colesterol (AGI + COL.) en comparación a la dieta control y la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados. No obstante, estas diferencias no fueron significativas.

Así mismo, la ganancia de peso se mantuvo constante a lo largo del estudio y no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.2.). Una vez más, se esperaba que no hubiera diferencias entre los grupos puesto que todos consumieron la misma dieta durante la mayor parte del estudio y adicionalmente se trató de un estudio agudo donde no se pretendía inducir obesidad por la dieta alta en grasa en los grupos experimentales.

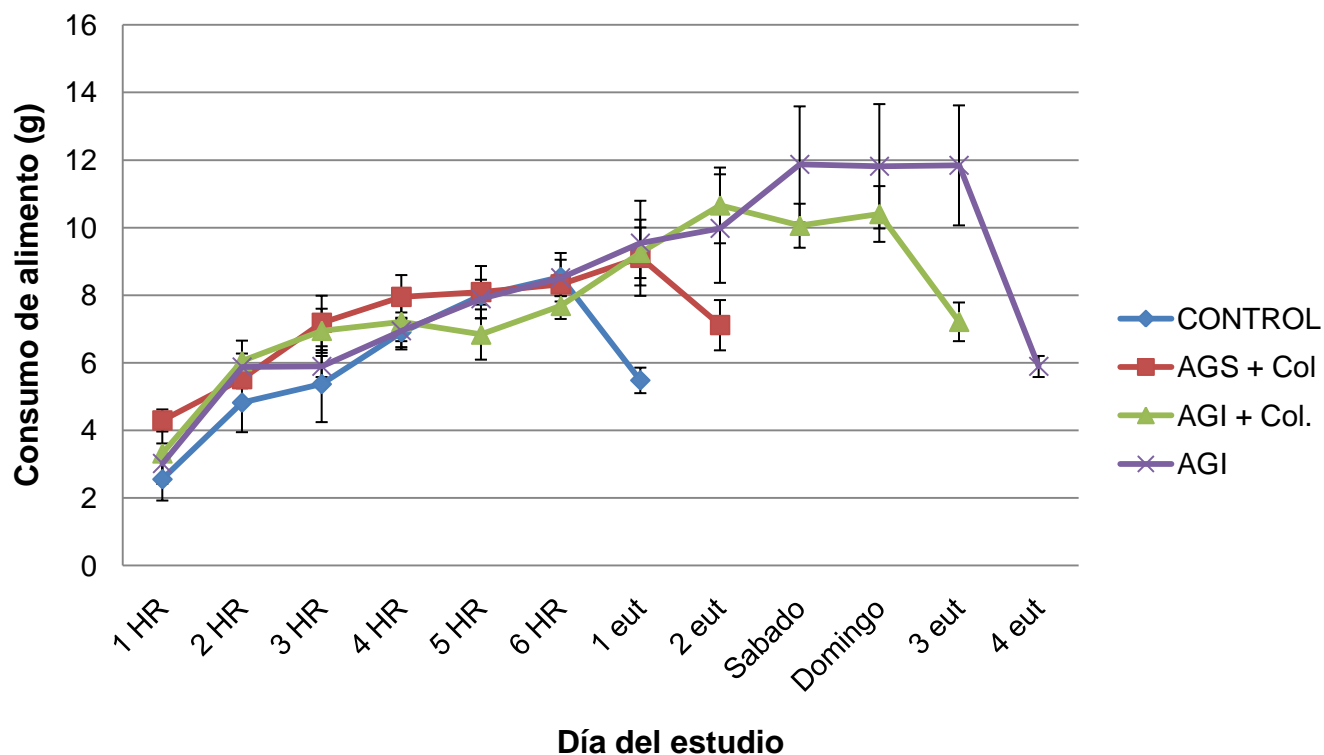


Figura 4.1. Consumo de alimento (gr) por grupo experimental por día del estudio. Los resultados se expresan \pm el error estándar de cada grupo con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol, HR=horario restringido, eut=día de eutanasia.

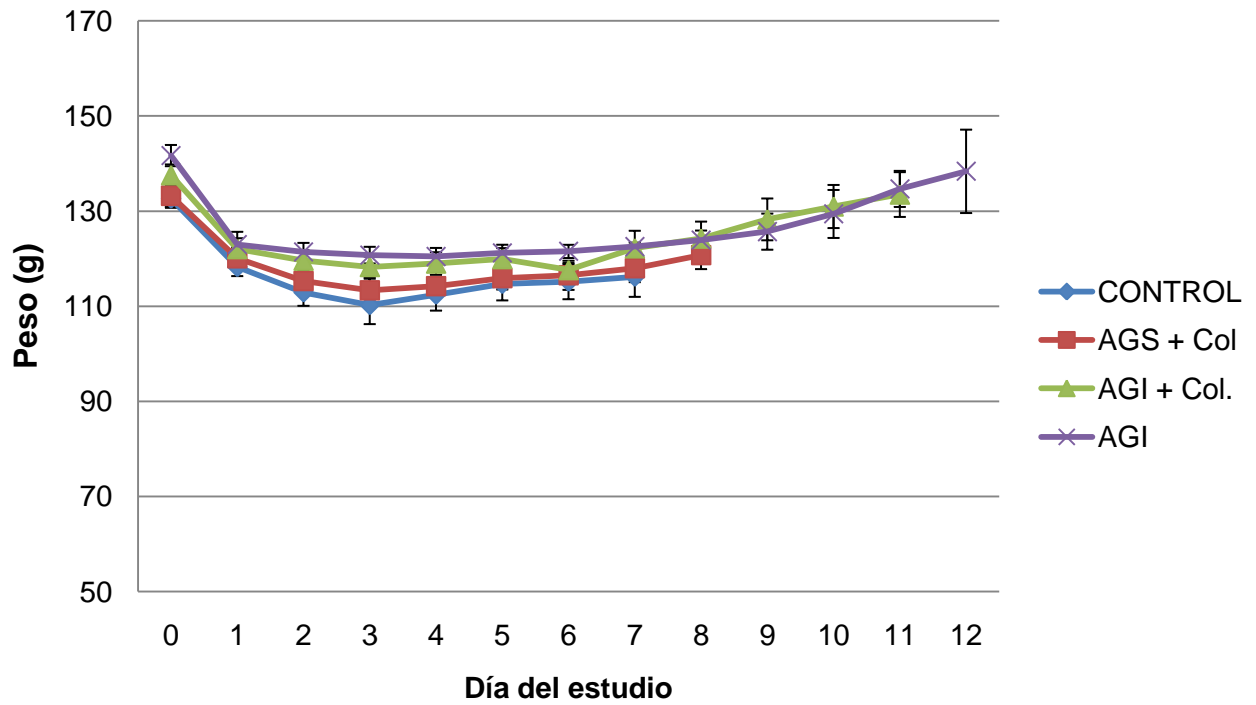


Figura 4.2. Ganancia de peso (gr) por día del estudio. Los resultados se expresan \pm el error estándar de cada grupo con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

B. Parámetros bioquímicos y hormonales: glucosa, insulina y glucagon

Estudios previos han reportado que el consumo de una dieta alta en grasa provoca cambios en las concentraciones séricas de la glucosa e insulina, lo que provoca la aparición de diabetes a largo plazo. Para evaluar el efecto agudo que las distintas dietas altas en grasa tienen sobre el metabolismo de la glucosa durante el postprandio, se determinaron los niveles de glucosa, insulina y glucagon en el suero recolectado de cada rata dos horas posteriores al consumo de la dieta experimental.

Como se puede observar en la Figura 4.3.A, la glucosa sérica no difirió de manera significativa entre los grupos experimentales. A su vez, los niveles de insulina del grupo control se mostraron ligeramente mayores a aquellos de los grupos experimentales, aunque esta diferencia sólo fue significativa en el caso del grupo que consumió una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados provenientes del aceite de soya y sin colesterol (Figura 4.3.B).

En el caso de los niveles de glucagon en suero, se registró que el consumo de una dieta alta en grasa disminuyó su concentración con respecto al grupo control, siendo aún más pronunciado en el caso de la dieta alta en AGI ya sea con o sin colesterol.

Estos resultados indican que el consumo agudo de una dieta alta en grasa parece estar activando mecanismos compensatorios que permiten que los niveles de glucosa se mantengan en niveles normales sin tener que recurrir a una mayor secreción de insulina. Los niveles estables de glucosa, aunado a la disminución en los niveles séricos de insulina en el grupo de AGI, sugiere que una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados favorece una mejor acción y señalización de esta hormona.

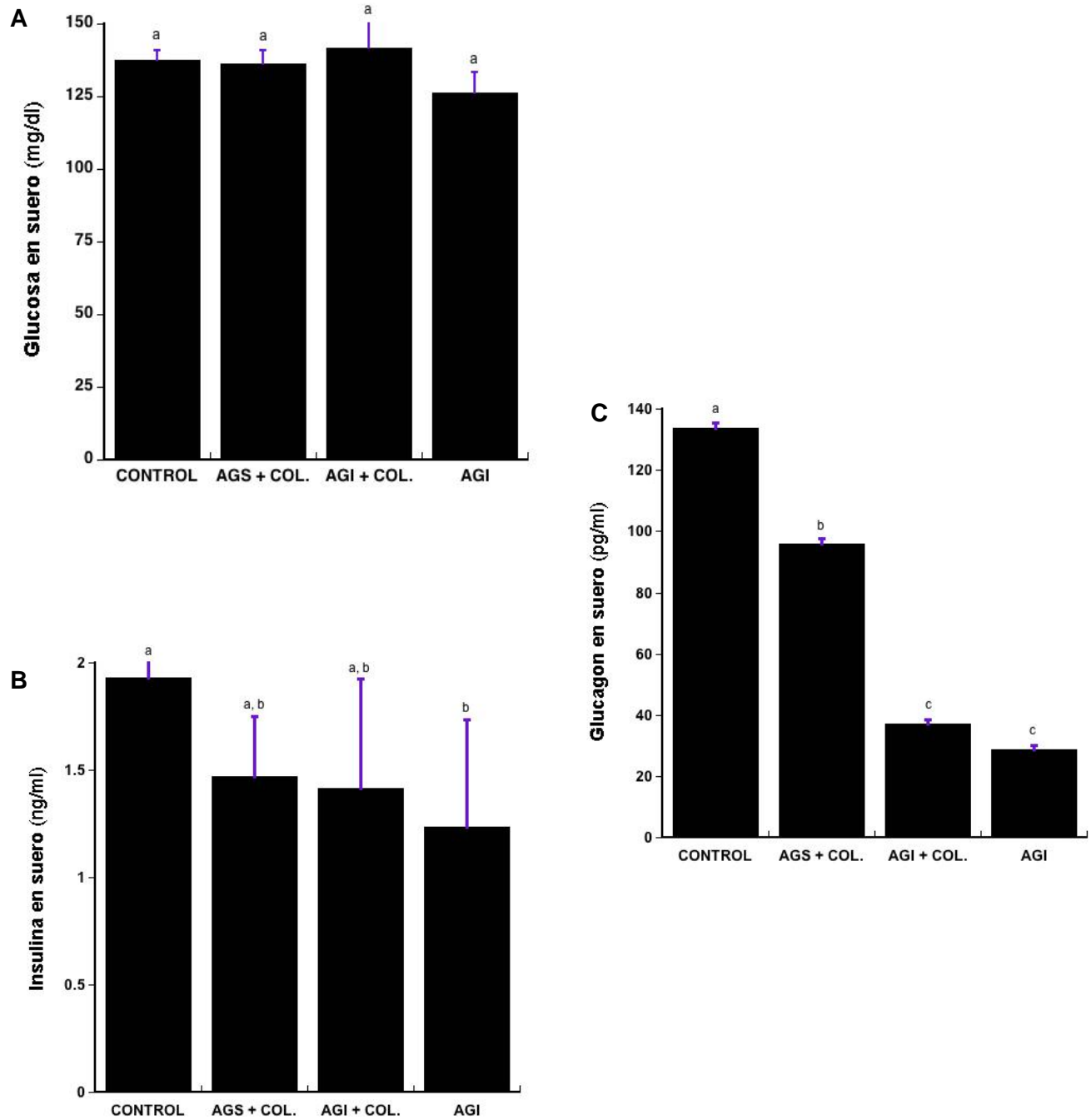


Figura 4.3. Concentraciones de glucosa (A), insulina (B) y glucagon (C) en suero de ratas con 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. Los valores se muestran como el promedio \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

C. Colesterol y triglicéridos en suero

Puesto que se ha reportado que dietas altas en grasa, en especial grasa saturada, provocan un aumento de los lípidos sanguíneos y con ello alteraciones en la señalización de la insulina, se determinaron las concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero para identificar si ocurre un fenómeno similar con el consumo agudo de este tipo de dietas.

Se puede observar que, acorde a lo esperado, el colesterol sérico se elevó de manera significativa en los grupos que consumieron una dieta alta en grasa con colesterol, ya sea rica en AGI o AGS. A pesar de mostrar un aumento en las concentraciones de colesterol en el grupo que consumió la dieta alta en AGI sin colesterol, no demostró ser significativo con respecto al grupo control (Figura 4.4.A). Por otro lado, en el caso de los triglicéridos en suero se mostró un aumento significativo de todos los grupos que consumieron una dieta alta en grasa con respecto a los niveles registrados en el grupo control (Figura 4.4.B).

Estos datos indican que el consumo agudo de una dieta alta en grasa incrementa los triglicéridos en suero independientemente del contenido de colesterol y el tipo de ácido graso. A su vez, el aumento del colesterol sérico aparece principalmente en respuesta al consumo de colesterol en la dieta.

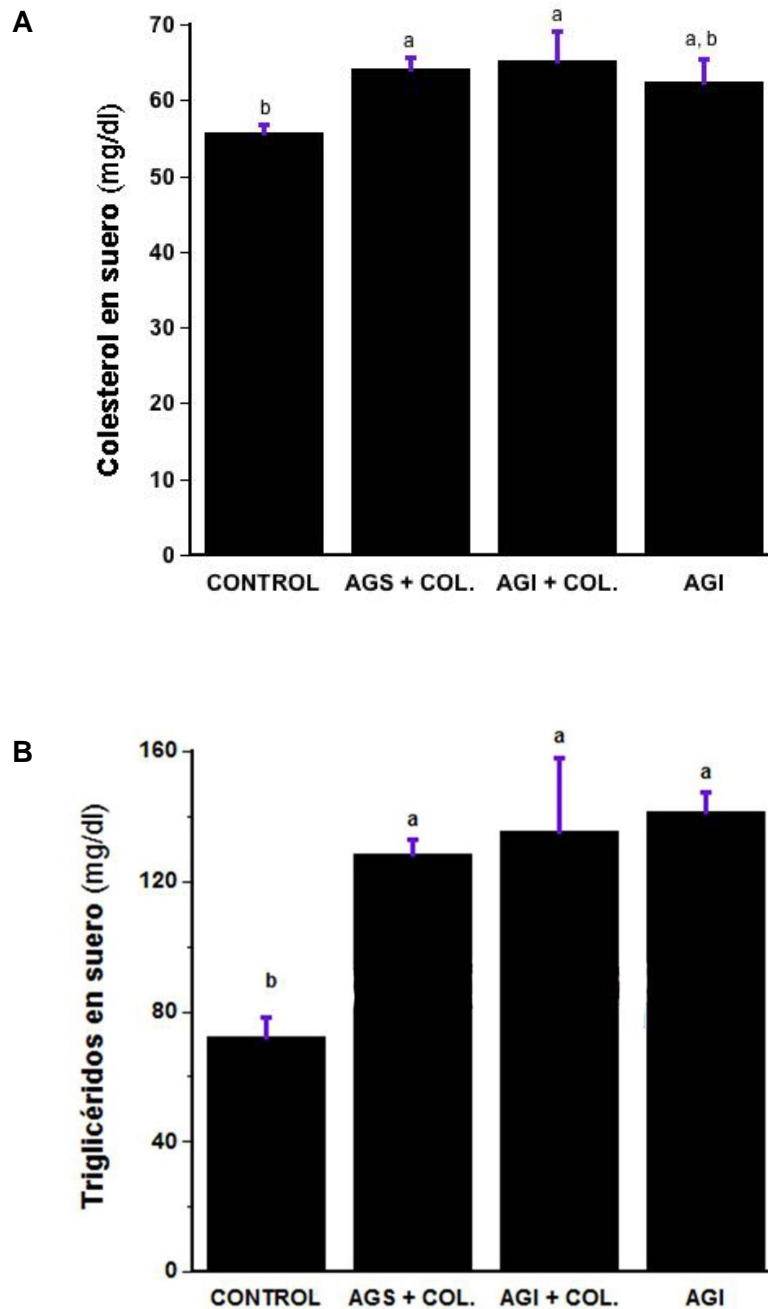


Figura 4.4. Concentraciones de colesterol (A) y triglicéridos (B) en suero de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin Colesterol. Los valores se muestran como el promedio \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados. COL.=Colesterol.

D. Expresión de genes lipogénicos hepáticos: PGC-1 β , SREBP-1c y FAS

Tomando en cuenta que el consumo agudo de dietas altas en grasa provocó un aumento en los niveles de triglicéridos en sangre independiente del contenido de colesterol y tipo de ácido graso, se procedió a medir la expresión de genes lipogénicos en hígado para identificar los mecanismos por los cuales ocurre este incremento. Los valores obtenidos son el resultado del análisis por RT-PCR tiempo real del mRNA de pools de hígados de cada grupo experimental, cada uno formado por 5 ratas.

Previo al análisis de la expresión de genes, se llevó a cabo un gel de integridad de RNA para verificar que las muestras se encontraran en condiciones aceptables tanto de pureza como de integridad. Como se observa en la Figura 4.5. las muestras de mRNA se encontraban sin degradar y libres de DNA.

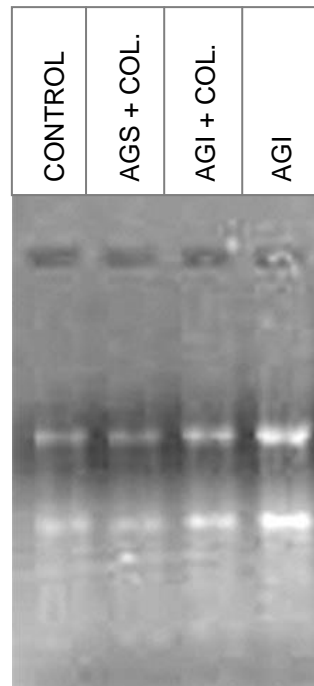


Figura 4.5. Gel de integridad de RNA AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

La Figura 4.6.A muestra los niveles de expresión de PGC-1 β relativo al grupo control. Se observa que PGC-1 β se incrementa con una dieta alta en grasa, ya sea mayormente compuesta de ácidos grasos saturados o poliinsaturados. No obstante, el colesterol presente en conjunto con la dieta AGI parece inhibir el aumento en expresión observado en los otros grupos experimentales. Dado que PGC-1 β está involucrado con el aumento de la expresión de genes tanto lipogénicos como oxidativos, los resultados confirman que una dieta alta en grasa incrementa la expresión de este coactivador en el hígado de las ratas ocasionando un incremento en la movilización de ácidos grasos. Esto se correlaciona con el incremento significativo que se observó en triglicéridos séricos en aquellos grupos que consumieron una dieta alta en grasa. Lo anterior quizás se deba a que el hígado busca compensar el incremento agudo en lípidos dietarios con una mayor tasa de metabolismo de los mismos.

A su vez, la expresión de SREBP-1c (Figura 4.6.B) aumentó con el consumo de una dieta alta en grasa saturada y colesterol, tal y como se esperaba. También se encontró disminuida en el caso de la dieta AGI con colesterol, siguiendo la tendencia observada en PGC-1 β . Por otro lado, la expresión de SREBP-1c en la dieta AGI mostró una tendencia a disminuir, aunque ésta no fue significativa con respecto al grupo control. Lo anterior sugiere que los ácidos grasos poliinsaturados actúan a nivel de la expresión de SREBP-1c en hígado para disminuir la lipogénesis.

Acorde a lo observado con la expresión de SREBP-1c, la expresión de FAS se encuentra disminuida en los grupos que consumieron una dieta alta en grasa poliinsaturada con respecto al grupo control y al grupo que consumió la dieta AGS y colesterol (Figura 4.6.C). De esta manera, una dieta alta en grasa incrementa la expresión de SREBP-1c mediada por PGC-1 β , favoreciendo así la síntesis de TG en hígado. Este efecto sin embargo, se ve inhibido por la presencia de colesterol en una la dieta AGI, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen esta activación a nivel de SREBP-1c y FAS.

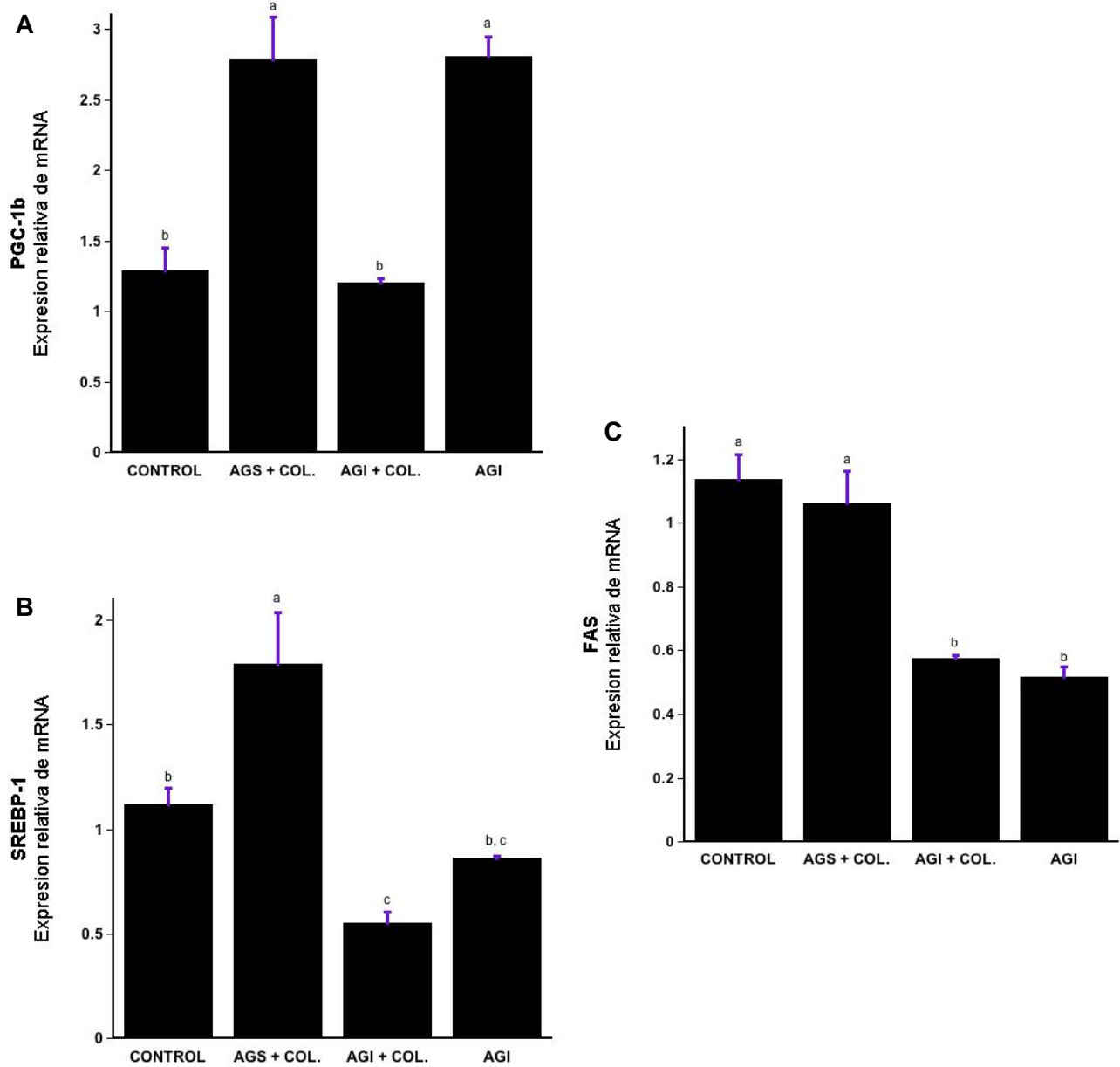


Figura 4.6. Expresión relativa de genes lipogénicos en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. Cofactor PGC-1 β (A), SREBP-1c (B) y FAS (C). Los valores se muestran como el promedio \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

E. Expresión de genes oxidativos hepáticos: PGC-1 α , PPAR α y CPT-1

Puesto que se ha demostrado que un incremento de la oxidación de ácidos grasos disminuye las concentraciones de triglicéridos circulantes, se decidió medir la expresión de genes oxidativos hepáticos en el postprandio para determinar si el tipo de ácido graso presente en la dieta juega un papel importante en la modulación de esta respuesta.

Los resultados (Figura 4.7.A) muestran que la expresión de PGC-1 α se encuentra incrementada de manera significativa en el grupo que consumió una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados sin colesterol. Los otros dos grupos experimentales que consumieron una dieta alta en grasa pero con colesterol también se encuentran incrementados, aunque en menor medida que el primero, con respecto al grupo control. Una vez más, la presencia de colesterol con AGI parece inhibir la activación de estos factores.

En términos de la expresión de PPAR α (Figura 4.7.B), resulta interesante que los datos siguen la misma tendencia que la expresión de PGC-1 β , donde las dietas altas en grasa muestran un incremento en la expresión independiente del tipo de ácido graso, mientras que la presencia de colesterol con una dieta AGI parece inhibir tal incremento.

Finalmente, los resultados de expresión de CPT-1 (Figura 4.7.C) se muestran congruentes con la activación de PPAR α , incrementándose de forma significativa en los grupos altos en grasa, excepto cuando hay presencia de colesterol con una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados. Esto indica que una dieta alta en grasa incrementa la expresión de PPAR α y CPT-1 mediante la activación de la expresión del mismo coactivador PGC-1 β , así como de PGC-1 α en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados. Este incremento en la oxidación de ácidos grasos en hígado se ve inhibido una vez más como en el caso de la lipogénesis por la presencia de colesterol en una dieta AGI.

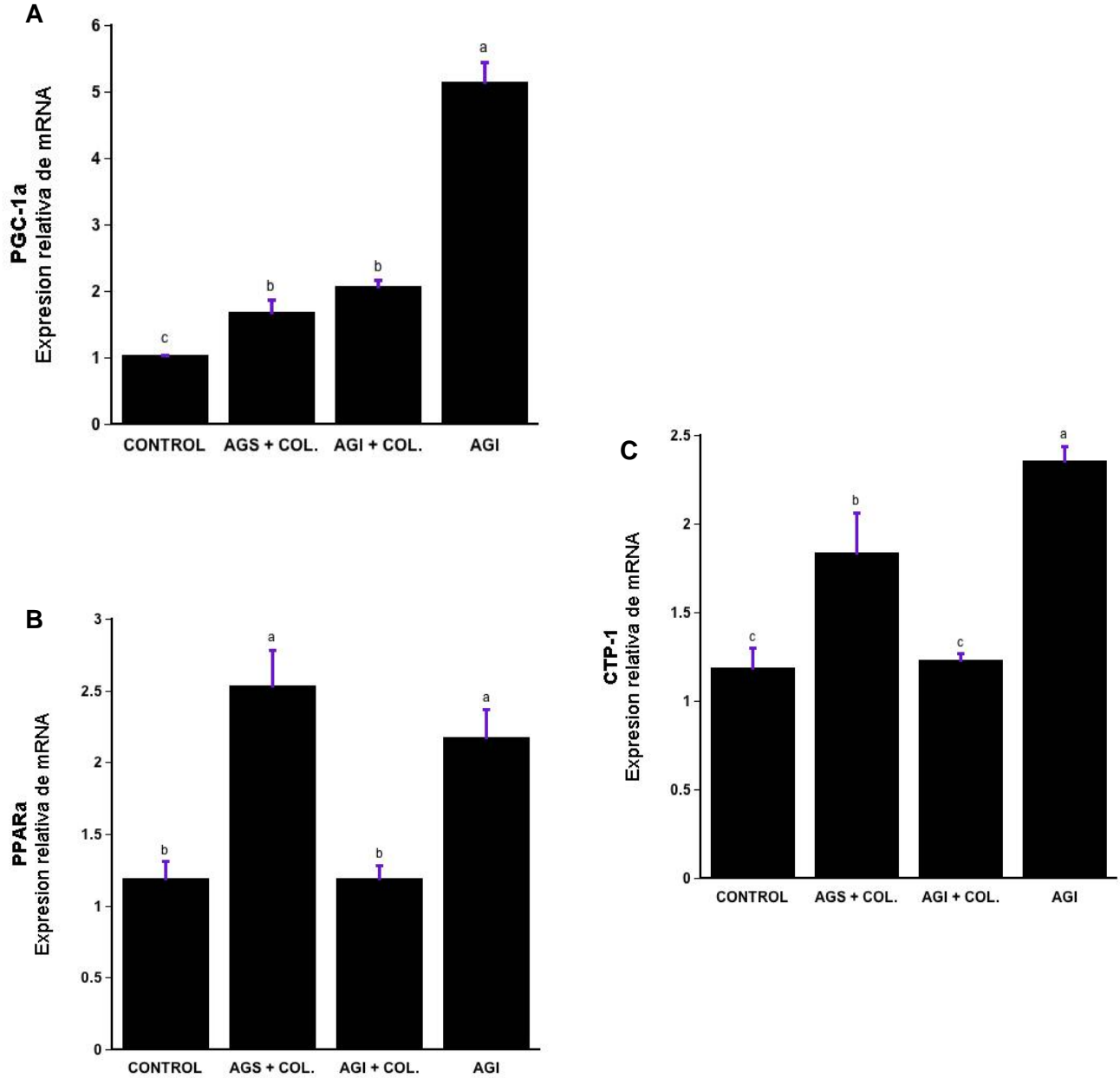


Figura 4.7. Expresión relativa de genes oxidativos en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. Cofactor PGC-1α (A), PPARα (B) y CPT-1 (C). Los valores se muestran como el promedio ± error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

F. Proteínas del metabolismo de lípidos hepático

Una vez determinada la expresión de genes de factores de lipogénesis y oxidación en hígado, se determinó la expresión de proteína de algunos de estos factores, lo que brinda una idea más clara de la actividad de los mismos.

El análisis de la expresión de SREBP-1c por Western Blot mostró la actividad de este factor como precursor y en su forma madura (Figura 4.8.A). La cantidad de SREBP-1c precursor es ligeramente menor en el caso de los grupos que consumieron la dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados con y sin colesterol, cuya tendencia es congruente con la expresión de este factor medida por RT-PCR. Al analizar la cantidad de SREBP-1c maduro entre el precursor, es decir la cantidad de este factor activa, se observa en la gráfica que efectivamente se encuentra incrementada en el caso de la dieta AGS y colesterol. En el caso de las dietas AGI y AGI con colesterol, se comprueba la inhibición en la maduración de SREBP-1c que se reporta que tienen los ácidos grasos poliinsaturados, al encontrarse una menor expresión de SREBP-1c maduro. La Figura 4.8.B muestra la expresión relativa de FAS, la cual sigue la misma tendencia que SREBP-1c en los grupos altos en grasa, siendo menor en los grupos altos en ácidos grasos poliinsaturados.

Por otro lado, la actividad de PPAR α se mostró incrementada significativamente en el grupo que consumió la dieta rica en AGI (Figura 4.8.C.). Tal incremento fue menor con la dieta AGI con colesterol y menor aún en la dieta alta en AGS y colesterol. Esto indica que los ácidos grasos poliinsaturados incrementan a PPAR α y con ello la oxidación de ácidos grasos, mientras que la presencia de colesterol y ácidos grasos saturados lo disminuyen.

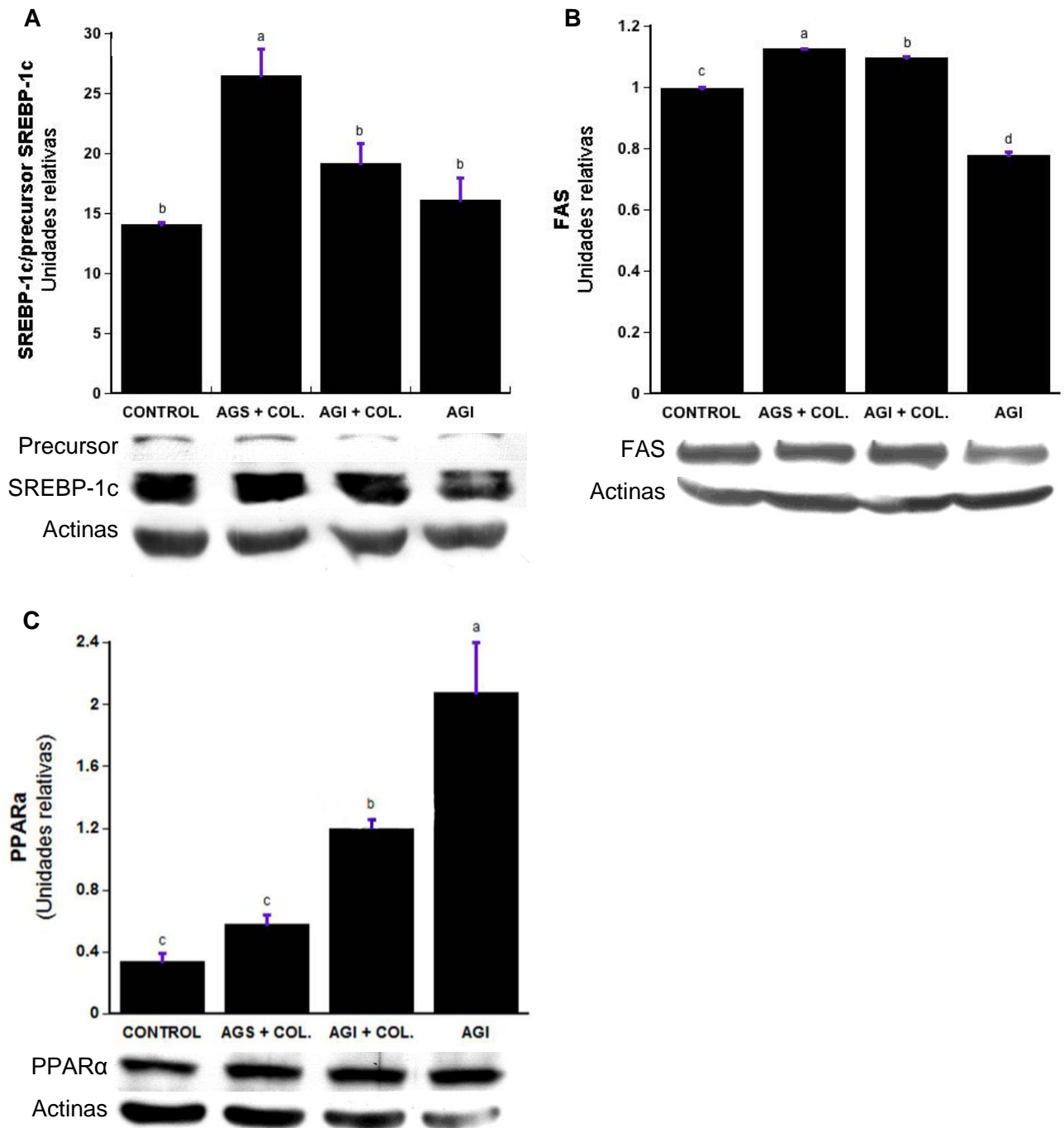


Figura 4.8. Expresión relativa de proteínas del metabolismo de lípidos en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. SREBP-1c (A), FAS (B) y PPAR α (C). Los valores se muestran como el promedio de expresión normalizado con Actina \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

G. Proteínas de la cascada de señalización de insulina

Se ha correlacionado el consumo de una dieta alta en grasa, especialmente grasa saturada, con la aparición de alteraciones en la cascada de insulina en hígado. Para evaluar el efecto que el consumo agudo de una dieta alta en grasa tiene sobre la expresión de factores de señalización de insulina, se analizó la expresión de IRS-1 y pIRS-1 Tyr⁹⁴¹. Los resultados mostraron que la expresión de IRS-1 no fue significativamente distinta entre los grupos, a excepción de un incremento en el caso de la dieta AGS y colesterol (Figura 4.9.A), pero su fosforilación sí se vio alterada por los distintos tipos de dieta de manera significativa.

El consumo de una dieta AGI incrementó la fosforilación de este factor en mayor medida que el consumo de una dieta AGS y colesterol (Figuras 4.9.B y C). Por ello, se observa que existe una mayor activación de la vía de señalización de la insulina con la dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados, mientras que una dieta rica en ácidos grasos saturados disminuye la activación de IRS-1, ocasionando probablemente alteraciones de la cascada de señalización de insulina en hígado.

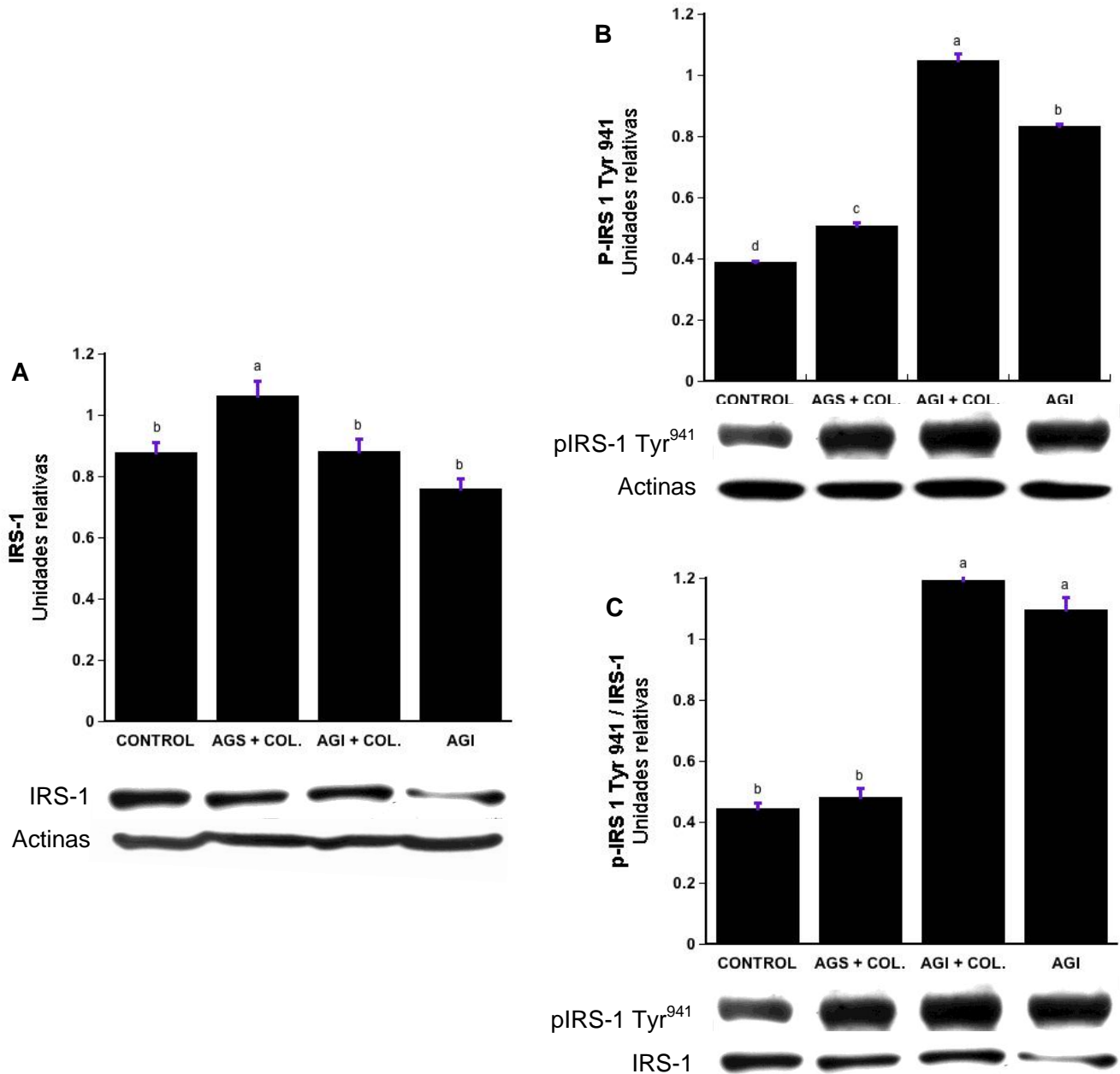


Figura 4.9. Expresión relativa de proteínas de la cascada de señalización de insulina en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. IRS-1 (A); pIRS-1 Tyr⁹⁴¹ (B); pIRS-1 Tyr⁹⁴¹/IRS-1 (C). Los valores se muestran como el promedio de expresión normalizado con Actina \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

H. Proteínas relacionadas con la inhibición de la señalización de insulina

Por otro lado, se sabe que la fosforilación de IRS-1 en el sitio Ser³⁰⁷ ocasiona que el sustrato no pueda unirse al receptor de insulina y que por lo tanto no se lleve a cabo la cascada de señalización de insulina. Se determinó por ello el grado de fosforilación en este sitio de IRS-1 con el consumo de dietas altas en grasa con distintos tipos de ácidos grasos y contenido de colesterol.

Los resultados en la Figura 4.10. muestran que, opuesto a lo observado con la fosforilación del sitio Tyr⁹⁴¹, la fosforilación de pIRS-1 Ser³⁰⁷ aumentó significativamente con una dieta AGS, en menor medida con la dieta AGI con colesterol y aún menos en el caso de la dieta AGI. Esto indica que tanto los ácidos grasos saturados como la presencia de colesterol inhiben a IRS-1 y la cascada de señalización de insulina.

Puesto que la activación de JNK está íntimamente relacionada con la fosforilación de p-IRS-1 Ser³⁰⁷, se evaluó la expresión de esta enzima en su forma activa (pJNK) y total (JNK). Los resultados de la figura 4.11 muestran que la cantidad de JNK así como su forma activa incrementa con una dieta alta en grasa saturada con colesterol, seguido de la dieta AGI con colesterol, de manera significativa con respecto al grupo control. A su vez, la dieta AGI inhibe la expresión de esta enzima. Estos resultados efectivamente se correlacionan con la fosforilación pIRS-1 Ser³⁰⁷.

Finalmente, se midió la expresión de TNF α para determinar si este factor proinflamatorio estaba involucrado en la inhibición en la cascada de insulina observada con las dietas altas en ácidos grasos saturados y colesterol. Como se muestra en la Figura 4.12, el consumo de una dieta alta en grasa saturada con colesterol efectivamente incrementó TNF α , mientras que en el resto de las dietas siguieron la misma tendencia que pJNK y pIRS-1 Ser³⁰⁷.

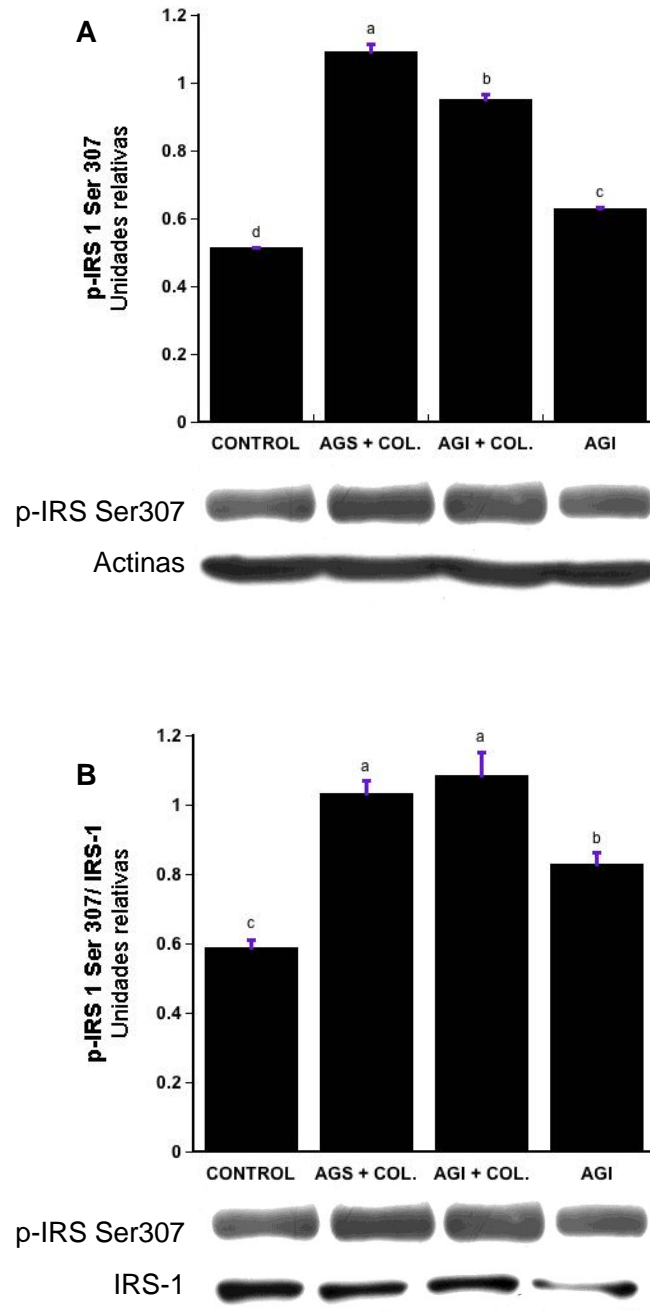


Figura 4.10. Expresión relativa de pIRS-1Ser307 (A) y pIRS-1Ser307/IRS-1 (B) en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. Los valores se muestran como el promedio de expresión normalizado con Actina \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

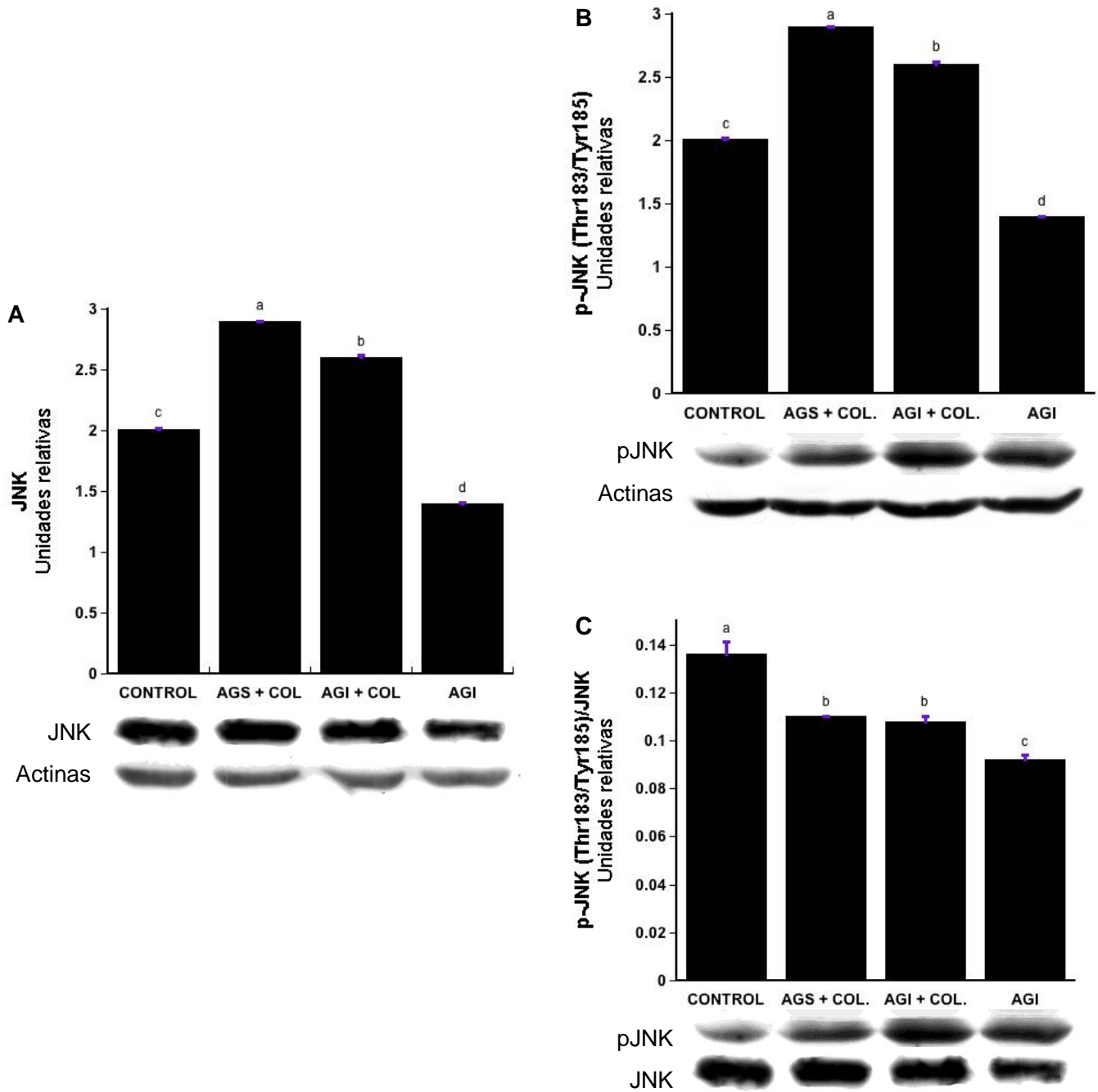


Figura 4.11. Expresión relativa de proteínas relacionadas con la inhibición de la señalización de insulina en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. JNK (A); pJNK (Thr183/Tyr185) (B); pJNK (Thr183/Tyr185)/JNK (C). Los valores se muestran como el promedio de expresión normalizado con Actina \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

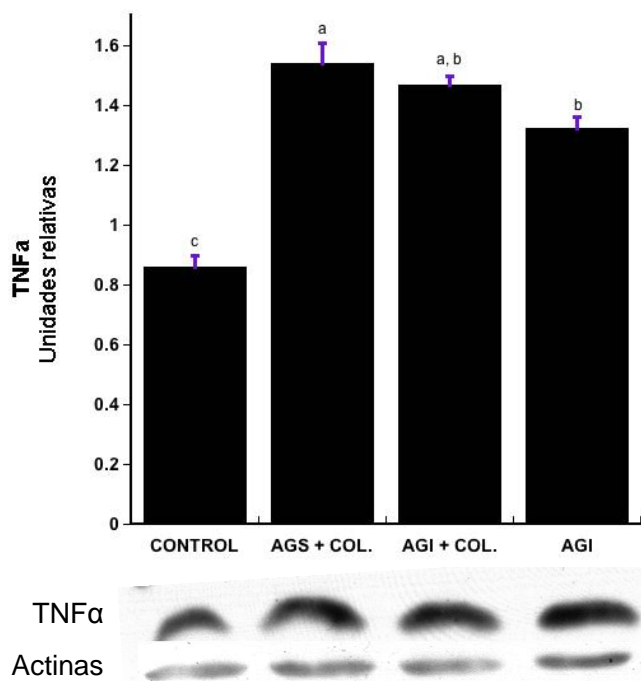


Figura 4.12. Expresión relativa de TNF α en hígado de ratas 2 horas posteriores al consumo de una dieta alta en grasa con o sin colesterol. Los valores se muestran como el promedio de expresión normalizado con Actina \pm error estándar con una $p < 0.05$. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, COL.=Colesterol.

V. DISCUSION

Con la ayuda de la Nutrigenómica se han podido elucidar los mecanismos de acción de los nutrimentos. Los nutrimentos pueden tener un efecto en la regulación de la expresión de genes a través de la unión a factores de transcripción, los cuales son sensores de los nutrimentos. De esta manera, los ácidos grasos poliinsaturados se unen principalmente al factor de transcripción PPAR α y los ácidos grasos saturados activan al factor de transcripción SREBP-1.

Consecuentemente, los nutrimentos pueden modificar el metabolismo y con ello influenciar la aparición de alteraciones y patologías. Por ejemplo, el consumo de una dieta alta en grasa saturada se ha asociado con mayor lipogénesis y acumulación de lípidos en hígado así como con el desarrollo de obesidad. Sin embargo, existen pocos estudios agudos en los que se demuestren los cambios tanto en expresión de genes y proteínas involucradas en la lipogénesis mediada por el factor de transcripción SREBP-1c, así como en la oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR α que se llevan a cabo en el hígado después del consumo de diferentes tipos de grasas de manera aguda durante el posprandio.

Los resultados muestran los diferentes cambios que ocurren en el hígado después del consumo agudo de una dieta alta en ácidos grasos saturados o poliinsaturados y colesterol. Con ello, es posible comprender que los cambios a corto plazo pueden dar lugar a las alteraciones observadas a largo plazo con diferentes tipos de grasas, lo que ocasiona la aparición de patologías como obesidad, esteatosis hepática, resistencia a la insulina y diabetes.

A. Dieta alta en grasa y metabolismo de lípidos: función central de PGC-1 β

PGC-1 β es un coactivador de PPAR α y SREBP-1c que se activa después del consumo de una dieta alta en grasas. Los resultados mostraron que

efectivamente el consumo agudo de una dieta alta en grasa incrementa la expresión de PGC-1 β en hígado. Adicionalmente, los resultados de este estudio indican que el consumo de colesterol en conjunto con una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados inhibe este aumento de expresión.

Como resultado de la expresión de PGC-1 β , se incrementa la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos en hígado mediante la activación de la expresión de SREBP-1c y PPAR α . Los resultados obtenidos indican por ello que la activación de PGC-1 β parece ser un mecanismo protector por el cual el hígado metaboliza el exceso de lípidos de la dieta y evita que se acumulen en el tejido. Lo anterior se muestra acorde también al incremento en los niveles de triglicéridos en suero con el consumo de una dieta alta en grasa.

Cabe destacar que el tipo de ácido graso presente en la dieta modula la expresión de ambas vías. Los ácidos grasos poliinsaturados mostraron disminuir la expresión génica y maduración de SREBP-1c en hígado, dando como consecuencia una menor lipogénesis que la observada con una dieta alta en ácidos grasos saturados. Lo anterior se muestra acorde a lo reportado (Clarke, 2000; Kim et al., 2002) sobre la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados de inhibir directamente la expresión y maduración (translocación al núcleo) de este factor de transcripción. A su vez, los ácidos grasos poliinsaturados mostraron incrementar la expresión de PGC-1 α , PPAR α y CPT-1, con lo que se activa la vía de la oxidación de manera preferente. Lo anterior es acorde a lo reportado (Obici y Rossetti, 2003; Lefebvre et al., 2006) de que los ácidos grasos poliinsaturados actúan como ligandos de PPAR α , activando a este factor y la expresión de enzimas oxidativas como CPT-1. Por otro lado, los ácidos grasos saturados de la dieta mostraron una preferencia por la activación de la vía lipogénica a la oxidativa. Estos efectos se muestran en la Figura 5.1.

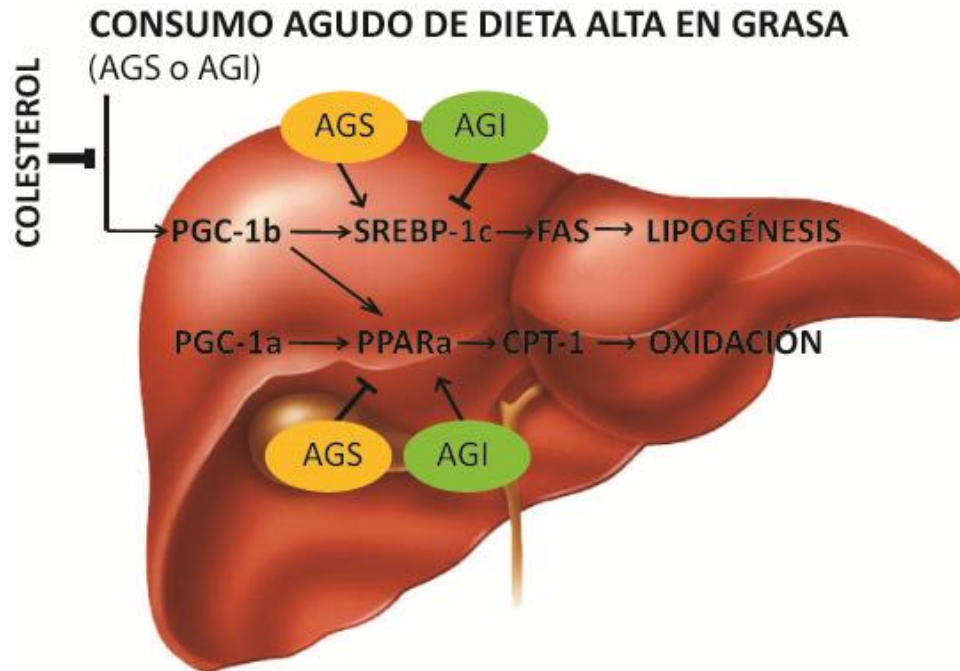


Figura 5.1. Efecto del consumo agudo de una dieta alta en grasa y el tipo de ácido graso que contiene sobre el metabolismo de lípidos en hígado. AGS=Dieta rica en ácidos grasos saturados, AGI=Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados.

En contraste con lo observado en este estudio, resultados de estudios previos en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ (datos no publicados) sugieren que el consumo crónico de una dieta alta en grasa (20%) inhibe tanto la expresión de factores lipogénicos como oxidativos. El consumo crónico de una dieta con 10% de grasa, por su parte, muestra una tendencia en activación de factores similar a la aquí reportada. Todo esto parece indicar que estos cambios adaptativos a corto plazo se mantienen a largo plazo siempre y cuando la dieta no sea demasiado alta en lípidos. Por el contrario, con un aumento excesivo de grasa (20%) de manera crónica se observa ya una disfunción en estos mecanismos lo que podría ocasionar una acumulación de lípidos intrahepáticos y mayores alteraciones inflamatorias y en la señalización de insulina, lo que finalmente podría desembocar en esteatosis hepática y resistencia a la insulina.

B. Señalización de insulina con dietas altas en grasa: efecto del tipo de ácido graso y colesterol.

Las dietas con diferentes tipos de ácidos grasos no solo ocasionan un desequilibrio entre la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos sino también un cambio en la señalización de la insulina. Los resultados aquí presentados indican que una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados incrementa la señalización y actividad de la insulina en hígado en comparación al grupo control. A su vez, una dieta alta en ácidos grasos saturados disminuye tal actividad.

Los resultados observados podrían ser causa de cambios en la composición de lípidos de la membrana plasmática, puesto que se ha reportado que los ácidos grasos saturados y el colesterol incrementan la rigidez de la misma e interfieren con el acoplamiento de IRS-1 con el receptor de insulina para la activación de la cascada de la insulina (Storlien et al., 2000; González-Muñoz et al., 2009).

Otro mecanismo por el cual se ha sugerido que los ácidos grasos modulan la señalización de insulina involucra la fosforilación de IRS-1 en Ser³⁰⁷, lo que impide que este sustrato se una a su vez al IR (Solinas et al., 2006). Los resultados de este trabajo muestran que efectivamente el consumo de una dieta alta en grasa saturada con colesterol incrementa pIRS-1 Ser³⁰⁷. Adicionalmente, esta fosforilación tiene un patrón similar a la activación de JNK y de TNF α , lo que sugiere que los ácidos grasos saturados alteran la cascada de señalización de insulina al menos en parte, debido a la activación de TNF α , JNK y pIRS-1 Ser³⁰⁷. Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados ocasionan una menor expresión de JNK y TNF α , lo cual puede deberse a la activación preferente que tienen por PPAR α , el cual se ha visto disminuye la expresión de factores proinflamatorios como TNF α (Nguyen et al., 2005; Jaeschke y Davis, 2007).

En conclusión, una dieta alta en ácidos grasos saturados y colesterol incrementa la lipogénesis de manera preferente a la oxidación de ácidos grasos en hígado, acorde a lo planteado en la hipótesis. No obstante, a diferencia de lo esperado, los niveles de triglicéridos no se mostraron mayores a los grupos experimentales que consumieron una dieta alta en AGI. Esto muy probablemente se deba a una mayor movilización de ácidos grasos en ambos grupos debido a una activación de PGC-1 β , lo que a su vez ocasiona una activación de LXR en hígado y con ello, la movilización de lípidos hepáticos.

Asimismo, una dieta rica en ácidos grasos saturados y colesterol propicia la expresión de factores proinflamatorios como TNF α , lo que incrementa la fosforilación de JNK y pIRS-1 Ser³⁰⁷. Al verse fosforilado este sitio en IRS-1, se inhibe su capacidad de unirse al receptor de insulina en la membrana celular y propagar la cascada de señalización de la insulina. Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada al inicio del proyecto. Sin embargo, los niveles de glucosa e insulina en suero sugieren que no existe en este punto una alteración de resistencia a la insulina como tal. Esto podría deberse a una acción compensatoria por parte de IRS-2 a nivel del hígado, por lo que la insulina aún podría llevar a cabo su función en el metabolismo a pesar de existir ya una disfunción nivel de IRS-1.

Por otro lado, una dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados incrementa la señalización de la insulina medida por pIRS-1 Tyr⁹⁴¹. A su vez, disminuye la expresión de TNF α y JNK, con lo que se previene la fosforilación de IRS-1 en Ser³⁰⁷ y la inhibición de la cascada de señalización de la insulina. Parte de estos efectos pueden deberse a la activación preferente que los ácidos grasos poliinsaturados tienen sobre PPAR α , lo que a su vez disminuye a factores de inflamación como TNF α . La activación de PPAR α también propicia una mayor expresión de CPT-1 y la oxidación de ácidos grasos en el hígado. A su vez, los AGI inhiben la expresión y maduración de SREBP-1c y con ello la expresión de FAS y la lipogénesis hepática.

Finalmente, cabe mencionar que la presencia de colesterol en una dieta alta en AGI atenúa los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados como es la activación de PGC-1 β , la oxidación de ácidos grasos, la inhibición de la lipogénesis y la disminución de factores que alteran la cascada de señalización de la insulina. En la Figura 5.2. se detallan los efectos que el consumo agudo de una dieta alta en grasa saturada o poliinsaturada tiene sobre la cascada de señalización de insulina y el metabolismo de lípidos.

Por tratarse de un estudio agudo no se evidenciaron alteraciones de resistencia a la insulina o acumulación de lípidos hepáticos. No obstante, estos resultados muestran cómo las adaptaciones que el organismo lleva a cabo para lidiar con el exceso de ácidos grasos a corto plazo pueden eventualmente causar alteraciones si se continúa consumiendo de manera crónica. Lo anterior se muestra acorde a lo observado en otro estudio llevado a cabo en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ donde el consumo de una dieta al 10% de grasa de manera crónica muestra un patrón muy similar al aquí reportado, donde el tipo de ácido graso aún modula la activación preferente de la lipogénesis o la oxidación y con ello, de la acumulación de lípidos en hígado y alteraciones en la señalización de la insulina. No obstante, un consumo del 20% de grasa de manera crónica ocasiona ya una inhibición de ambas vías lo que da como consecuencia una menor movilización de lípidos y mayores alteraciones metabólicas (datos no publicados).

Con ello, se pone en evidencia la importancia fundamental que tanto el tipo como la cantidad de ácidos grasos en la dieta tienen para el metabolismo de lípidos hepáticos y la señalización de insulina. La modificación de ambas variables en la dieta puede ser por ello de enorme utilidad para prevenir o tratar alteraciones metabólicas que desembocan en resistencia a la insulina, obesidad, esteatosis hepática y Diabetes Mellitus en personas susceptibles.

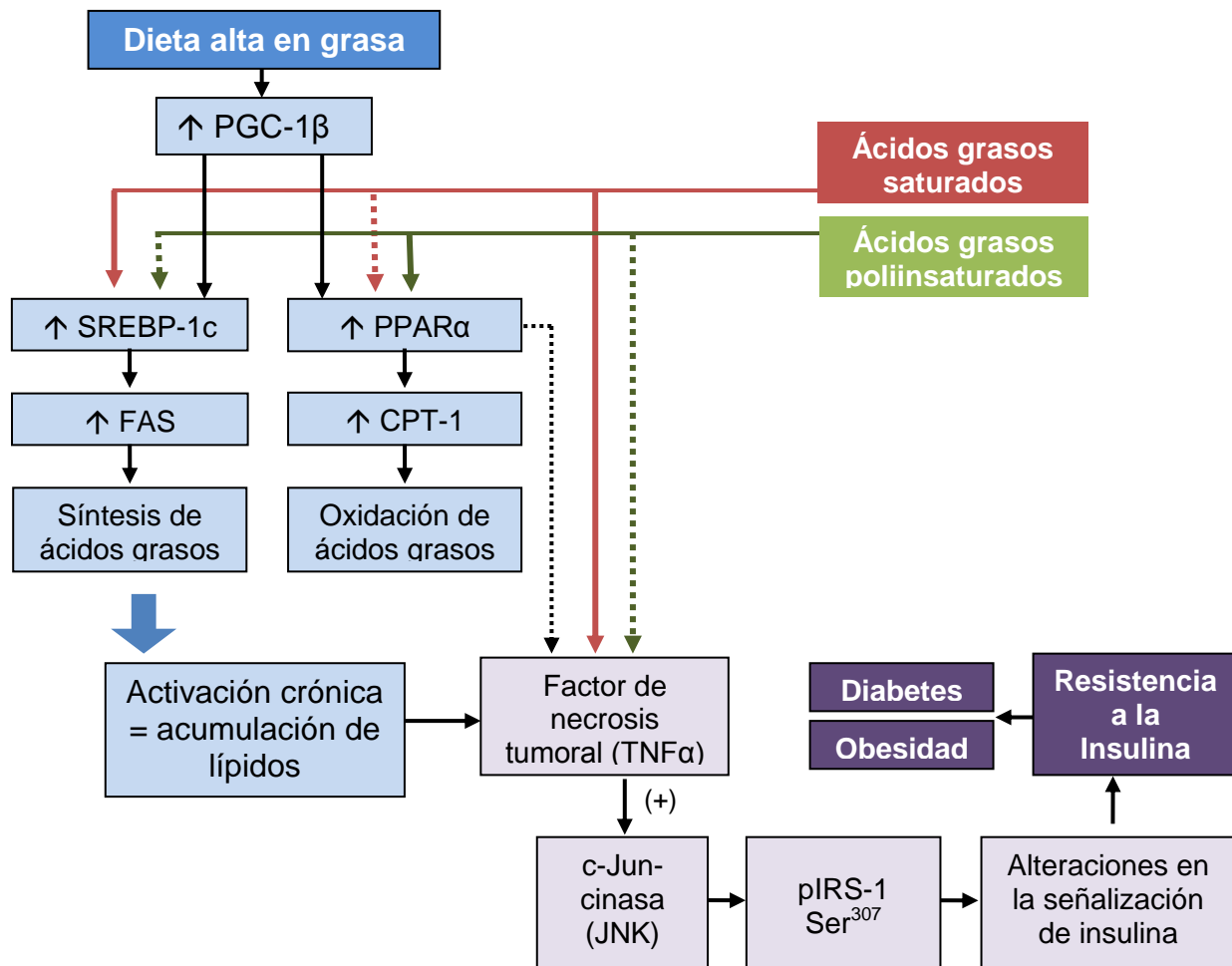


Figura 5.2. Alteración en la expresión de factores del metabolismo de lípidos y la señalización de insulina por el consumo de una dieta alta en grasa y el tipo de ácido graso. Línea punteada=inhibe, línea continua y (+)=estimula.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, V., E. Werner, J. Giraud, Y. Lee, S. Shoelson, and M. White. 2002. Phosphorilation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.* 277(2):1531-1537.
- Allmann, D., and D. Gibson. 1969. Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *J. Lipid Res.* 6:51–62.
- Azzout-Marniche, D., D. Becard, C. Guichard, M. Foretz, P. Ferre, and F. Foufelle. 2000. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochemistry. J.* 350:389-393.
- Basciano, H., A. Miller, M. Naples, C. Baker, R. Kohen, E. Xu, Q. Su, E. Allister, M. Wheeler, y K. Adeli. 2009. Metabolic effects of dietary cholesterol in an animal model of insulin resistance and hepatic steatosis. *A, j, Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E462-E473.
- Beier, K., A. Völkl, and D. Fahimi. 1997. TNF- α downregulates the peroxisome proliferator activated receptor- α and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS letters.* 412(2): 385-387.
- Belfort, R., L. Mandarino, S. Kashyap, K. Wirfel, T. Pratipanawatr, R. Berria, R. DeFronzo, and K. Cusi. 2005. Dose-Response Effect of Elevated Plasma Free Fatty Acid on Insulin Signaling. *Diabetes.* 54:1640-1648.
- Biddinger, S., A. Hernandez, C. Madsen, J. Haas, J. Alemán, R. Suzuki, E. Scapa, C. Agarwal, M. carey, G. Stephanopoulos, D. Cohen, G. King, H. Ginsberg, y R. Kahn. 2008. Hepatic Insulin Resistance Is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Suceptibility to Atherosclerosis. *Cell Metab.* 7:125-134.
- Boura-Halfon, S. and Y. Zick. 2009. Phosphorilation of IRS proteins, insulin action and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. & Metab.* 296:E581-E591.
- Choi, K., O. Ryu, K. Lee, H. Kim, J. Seo, S. Kim, N. Kim, D. Choi, S. Baik, and K. Choi. 2005. Effect of PPAR- α and - γ agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF- α in visceral fat of OLETF rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 336(3):747-753.
- Clarke, S. 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.* 83(Suppl. 1):S59–S66.
- Córdova Villalobos, J. A., G. M. Lee, M. Hernández Ávila, C. A. Aguilar Salinas, J. A. Barriguete-MeléndeZ, P. Kuri Morales, A. Lara Esqueda, C. Álvarez Lucas,

- V. Molina Cuevas, S. Barquera, M. Rosas Peralta, y A. González Chávez. 2008. Plan de prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas: sobrepeso, riesgo cardiovascular y diabetes mellitus, 2007-2012 y sistema de indicadores de Diabetes en México. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 16(3):104-107.
- Dong, X., S. Park, X. Lin, K. Copps, X. Yi, and M. White. 2006. Irs 1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J. Clin. Invest.* 116(1):101-114.
- Eberlé, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferré, and F. Fouché. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86:839–848.
- Endo, M., T. Masaki, M. Seike, and H. Yoshimatsu. 2007. TNF- α Induces Hepatic Steatosis in Mice by Enhancing Gene Expression of Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c). *Exp. Biol. Med.* 232:614-621.
- Feige, J., and J. Auwerx. 2007. Transcriptional co regulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* 17(6):292-301.
- Frangioudakis, G., J. M. Ye, and G. J. Cooney. 2005. Both saturated and n-6 polyunsaturated fat diets reduce phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and protein kinase b in muscle during the initial stages of *in vivo* insulin stimulation. *Endocrinology*. 146: 5596–5603.
- Fungwe T. V., J. E. Fox, L. M. Cagen, H. G. Wilcox, and M. Heimberg. 1994. Stimulation of fatty acid biosynthesis by dietary cholesterol and of cholesterol synthesis by dietary fatty acid. *J. Lipid Res.* 35:311-318.
- Ghafoorunissa, A., L. Rajkumar, and V. Acharya. 2005. Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose-induced insulin resistance in rats. *J. Nutr.* 135: 2634–2638.
- Goalstone, M. L. and Draznin, B. 1997. Insulin signaling. *West J. Med.* 167:166-173.
- González, A. 1999. Consenso Mexicano de resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico. *Revista Mexicana de Cardiología*. 10(1):3-19.
- González-Muñoz, E., C. López-Iglesias, M. Calvo, M. Palacín, A. Zorzano, and M. Camps. 2009. Caveolin-1 Loss of Function Accelerates Glucose Transporter 4 and Insulin Receptor Degradation in 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrinology* 150:3493–3502.
- Gual, P., Y. Marchand-Brustel, and J. Tanti. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 87:99-109.

- Guo, S., K. Copps, X. Dong, S. Park, Z. Cheng, A. Poci, L. Rossetti, M. Sajan, R. Farese, and M. White. 2009. The Irs branch of the insulin signaling cascade plays a dominant role in hepatic nutrient homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 29(18):5070-5083.
- Hahn-Obercyger, M., L. Graeve, and Z. Madar. 2009. A high-cholesterol diet increases the association between caveolae and insulin receptors in rat liver. *J. Lipid Res.* 50:98-107.
- Herschkovitz, A., Y. Liu, E. Ilan, D. Ronen, S. Boura-Halfon, and Y. Zick. 2007. Common Inhibitory Serine Sites Phosphorylated by IRS-1 Kinases, Triggered by Insulin and Inducers of Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 282(25):18018-18027.
- Herzig, S. F. Long, U. Jhala, S. Hedricks, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman, and M. Montminy. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 413:179-183.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 420:333–336.
- Hotamisligil, G., D. Murray, L. Choy, and B. Spiegelman. 1994. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *PNAS.* 91:4854-4858.
- Hotamisligil, G. 1999. The role of TNF α and TNF receptor in obesity and insulin resistance. *J. Inter. Med.* 245:621-625.
- Jaeschke, A. and R. Davis. 2007. Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Mol. Cell.* 27:498-508.
- Jump, D., and S. Clarke. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nut.* 19:63–90.
- Kahn, B. and J. Flier. 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(4):473-481.
- Kim, H., M. Miyazaki, and J. Ntambi. 2002. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J. Lipid Res.* 43:1750-1757.
- Kim, M., T. Sweeney, J. Shigenaga, L. Chui, A. Moser, C. Grunfeld, and K. Feingold. 2007. Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXR α , PPAR α , PPAR γ , LXR α , and the coactivators SRC-1, PGC-1 α , and PGC-1 β in liver cells. *Metab. Clin. & Exp.* 56(2):267-279.

- Knight, B., A. Hebbachi, D. Hauton, A. Brown, D. Wiggins, D. Patel, and G. Gibbons. 2005. A role for PPAR α in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* 389:413–421.
- Krentz, A. 2003. *Insulin Resistance*. Blackwell Publishing. USA.
- Krycer, J., L. Sharpe, W. Luu, and A. Brown. 2010. The Akt–SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol. & Metab.* 30(10):1-9.
- Kubota, N., T. Kubota, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, T. Mineyama, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Ohsugi, T. Sasako, M. Moroi, K. Sugi, S. Kakuta, Y. Iwakura, T. Noda, S. Ohnishi, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2008. Dynamic functional relay between Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.* 8:49-64.
- Lefebvre, P., G. Chinetti, J. Fruchart, and B. Staels. 2006. Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116(3):571-580.
- Li, S., M. Brown, and J. Goldstein. 2009. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *PNAS*. Early edition:1-6.
- Lin, J., H. Wu, P. Tarr, C. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. Olson, B. Lowell, R. Bassel-Duby, and B. Spiegelman. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 418: 797-801.
- Lin, J., P. Tarr, R. Yang, J. Rhee, P. Puigserver, C. Newgard, and B. Spiegelman. 2003. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 278(33):30843-30848.
- Lin, J., R. Yang, P. Tarr, P. Wu, C. Handschin, S. Li, W. Yang, L. Pei, M. Uldry, P. Tontonoz, C. Newgard, and B. Spiegelman. 2005a. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fat mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell*. 120:261-273.
- Lin, J., C. Handschin, and B. Spiegelman. 2005b. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription cofactors. *Cell Metab.* 1:361-370.
- Liu, C.H., M. Huang, and P.C. Huang. 1995. Sources of triacylglycerol accumulation in livers of rats fed a cholesterol-supplemented diet. *Lipids*. 30(6):527-531.
- Lizcano, J., and D. Alessi. 2001. The insulin signaling pathway. *Current Biol.* 12(7):R236-R238.

- Nagai, Y., S. Yonemitsu, D. Erion, T. Iwasaki, R. Stark, d. Weismann, J. Dong, D. Zhang, M. Jurczak, M. Löffler, J. Cresswell, X. Yu, S. Murray, S. Bhanot, B. Monia, J. Bogan, V. Samuel, and G. Shulman. 2009. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 β in the Pathogenesis of Fructose-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 9:252-264.
- Naïmi, M., C. Arous, and E. Obberghen. 2009. Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. & Metab.* 21(2):75-82.
- Nguyen, M., H. Satoh, S. Favelyukis, J. Babendure, T. Imamura, J. Sbodio, J. Zalevsky, B. Dahiyat, N. Chi, and J. Olefsky. 2005. JNK and Tumor Necrosis Factor- α Mediate Free Fatty Acid-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280(42):35361-35371.
- Obici, S. and L. Rossetti. 2003. Minireview: Nutrient sensing and regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology.* 144(12):5172-5178.
- Olaiz-Fernández, G., R. Rojas, C. A. Aguilar-Salinas, J. Rauda, y S. Villalpando. 2007. Diabetes mellitus en adultos mexicanos: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Púb. Méx.* 49(Suppl. 3):s331-s337.
- Paz, K., R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhananyi, H. Kanety, and Y. Zick. 1997. A molecular basis for insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 272(47):29911-29918.
- Pessin, J. E. and Saltiel, A. R. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(2):165-169.
- Pettinelli, P., T. del Pozo, J. Araya, R. Rodrigo, V. Araya, G. Smok, A. Csendes, L. Gutierrez, J. Rojas, O. Korn, F. Maluenda, J. Diaz, G. Rencoret, I. Braghetto, J. Castillo, J. Poniachik, and L. Videla. 2009. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: Correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1792:1080–1086.
- Reeves, P., F. Nielsen, and G. Fahey. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nut.* 123. 1939-1951.
- Rodríguez, M., A. Tovar, M. del Prado, y N. Torres. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev. Invest. Clin.* 57(3):457-472.
- Rui, L., V. Aguirre, J. K. Kim, G. I. Shulman, A. Lee, A. Corbould, A. Dunaif, and M. F. White. 2001. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser³⁰⁷ via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 107:181–189.

- Saltiel, A. and Kahn, R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799-806.
- Saltiel, A. and J. Pessin. 2002. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 12(2):65-71.
- Schenk, S., M. Saberi, and M. Olefsky. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118(9):2992-3002.
- Serlie, M., A. Meijer, J. Groener, M. Duran, E. Endert, E. Fliers, J. M. Aerts, and H. P. Sauerwein. 2007. Short-Term Manipulation of Plasma Free Fatty Acids Does Not Change Skeletal Muscle Concentrations of Ceramide and Glucosylceramide in Lean and Overweight Subjects. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* 92(4):1524–1529.
- Shulman, G. I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106(2):171-176.
- Solinas, G., W. Naugler, F. Galimi, M. S. Lee, and M. Karin. 2006. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates. *PNAS*. 103(44):16454–16459.
- Sonoda, J. I. Mehl, L. Chong, R. Nofsinger, and R. Evans. 2007. PGC-1 β controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *PNAS*. 104(12):5223-5228.
- Stein, D., B. Stevenson, M. Chester, M. Basit, M. Daniels, S. Turley, and D. McGarry. 1997. The Insulinotropic Potency of Fatty Acids Is Influenced Profoundly by Their Chain Length and Degree of Saturation. *J. Clin. Invest.* 100(2):398–403.
- Storlien, L., J. Higgins, T. Thomas, M. Brown, H. Wang, X. Huang, and P. Else. 2000. Diet composition and insulin action in animal models. *Br. J. Nutr.* 83(1):S85-S90.
- Taouis, M., C. Dagou, C. Ster, G. Durand, M. Pinault, and J. Delarue. 2002. N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. & Metab.* 282:664-671.
- Thirone, A., C. Huang, and A. Klip. 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol. & Metab.* 17(2):70-76.
- Todoric, J., M. Löffler, J. Huber, M. Bilban, M. Reimers, A. Kadl, M. Zeyda, W. Waldhäusl, and T. M. Stulnig. 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*. 49:2109–2119.

- Torres, N. 2010. Reflexiones sobre la Nutrigenómica. *Red Nutrición*. 1(1):6-9.
- Tovar, A., N. Manzano, and N. Torres. 2005. Regulación del metabolismo del colesterol y ácidos grasos en el síndrome nefrótico experimental por las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBPs): efecto de la soya. *Gac. Méd. Méx.* 141(5):407-415.
- Vallim, T., and A. M. Salter. 2010. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 82(4-6):211-218
- Vianna, C., M. Huntgeburth, R. Coppari, C. Choi, J. Lin, S. Krauss, G. barbatelli, I. Tzameli, Y. Kim, S. Cinti, G. Shulman, B. Spiegelman, and B. Lowell. 2006. Hypomorphic mutation of PGC-1 β causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. *Cell Metab.* 4:453-462.
- Wang, Y., B. Zhang, Y. Xue, Z. Li, J. Wang, C. Xue, and T. Yanagita. 2010. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids in Health and Disease*. 9(4):1-6.
- Werner, E. D., J. Lee, L. Hansen, M. Yuan, and S. Shoelson. E. 2004. Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J. Biol. Chem.* 279(34):35298–35305.
- White, M. F. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E413–E422.
- Worgall, T., S. Sturley, T. Seo, T. Osborne, and R. Deckelbaum. 1998. Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Expression of Promoters with Sterol Regulatory Elements by Decreasing Levels of Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 273:25537-25540.
- Xu, G., L. Pan, H. Li, Q. Shang, A. Honda, S. Shefer, J. Bollineni, Y. Matsuzaki, G. Tint, and G. Salen. 2004. Dietary cholesterol stimulates 15921680373CYP7A1 in rats because farnesoid x receptor is not activated. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286:730-735.
- Yoon, J., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Safford, C. Kahn, D. Granner, C. Newgard, and B. Spiegelman. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 413:131-138.

ANEXOS

ANEXO I – Medición de glucosa en suero

1. Poner a descongelar las muestras de suero en hielo.
2. Mezclar por vortex.
3. Acercar la muestra a la aguja del aparato YISA hasta que llegue a la mitad del tubo para que succione la muestra.
4. Calibrar el aparato cada 6 tomas con un estándar de glucosa.

ANEXO II - Medición de insulina en suero por RIA Kit

Día 1

1. Añadir el buffer de ensayo a los tubos 3 y 4(200µl) y al 5 y 6 (100µL).
2. Añadir 100µL del estándar y control de calidad a los tubos 7-20 (van por duplicado).
3. Añadir 100µL de la muestra de suero a los tubos restantes por duplicado.
* si se usan 50µL de muestra añadir otros 50µL del buffer de ensayo.
4. Añadir 100µL de I-insulina a todos los tubos.
5. Añadir 100µL de anticuerpo de insulina de rata a todos los tubos excepto del 1-4.
6. Dar vortex, cubrir e incubar de 20-24hrs a 4°C.

Día 2

1. Añadir 1ml de reactivo precipitante a 4°C a todos los tubos excepto 1-2.
2. Dar vortex e incubar 20 min a 4°C.
3. Centrifugar excepto tubos 1-2.
 - 4°C, 20 min, 2000-3000 xg.
4. Tomar el sobrenadante y drenar los tubos al menos de 15-60seg 1 sola vez.
5. Contar por 1 minuto en un contador de gamma y calcular los ng/ml.

CALCULOS

1. Obtener el promedio de cada duplicado.
2. Restar el promedio de los tubos 3- 4 de cada uno de los demás promedios.
3. Calcular el % del marcador ligado (entre 35 y 50%).
 - porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2.
4. Calcular el % de adherencia de cada muestra y estándar.
 - $\%B/B_0 = (\text{Muestra o estándar/tubos 5-6}) \times 100$
5. Graficar el %B/B₀ de cada estándar en el eje de las “y” así como la concentración conocida en el de las “x”.
6. Construir la curva de referencia.
7. Calcular los µg/ml de cada muestra usando la curva de referencia.
8. Para convertir de µg/ml a pM multiplicar por 175.
 - Los duplicados no deben exceder 10% CV entre ellos
 - Normal en ayuno: 0.5 – 2.0 ng/ml

ANEXO III – Medición de glucagon en suero por RIA kit

Día 1

1. Añadir 300µL del buffer de ensayo a los tubos 3 y 4, 200µL a los tubos 5 y 6 y 100µL del tubo 7 en adelante.
2. Pipetear 100µL del estándar y controles de calidad por duplicado.
3. Pipetear 100µL de cada muestra por duplicado.
4. Agregar 100µL del anticuerpo de glucagon a todos los tubos excepto al 1, 2, 3 y 4.
5. Dar vórtex, cubrir e incubar de 20-24hrs a 4°C.

Día 2

1. Hidratar el marcador 125I-Glucagon con 27 mL del Label Hydrating Buffer, mezclar suavemente y agregar 100 µL a cada tubo.
2. Dar vórtex, cubrir e incubar de 22-24hrs a 4°C

Día 3

1. Agregar 1mL de agente precipitante frío (4°C) a todos los tubos excepto al 1 y 2.
2. Dar vórtex e incubar 20min a 4°C.
3. Centrifugar 20min a 4°C de 2,000-3,000 xg.
4. Drenar el sobrenadantes de todos los tubos excepto los tubos 1 y 2 y analizar con un contador gamma de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

CALCULOS

1. Obtener el promedio de cada duplicado.
2. Restar el promedio de los tubos 3- 4 de cada uno de los demás promedios
3. Calcular el % del marcador ligado (entre 35 y 50%)
 - porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2
4. Calcular el % de adherencia de cada muestra y estándar
 - $\%B/B_0 = (\text{Muestra o estándar}/\text{tubos 5-6}) \times 100$
5. Graficar el %B/B₀ de cada estándar en el eje de las y y la concentración conocida en el de las x
6. Construir la curva de referencia
7. Calcular los µg/ml de cada muestra usando la curva de referencia
 - Normal en ayuno: 50-150 pg/ml

ANEXO IV – Medición de triglicéridos en suero

Determinación cuantitativa *In vitro* de triglicéridos en suero con el reactivo triglicéridos FS en equipo fotométrico.

1. Añadir en tubos eppendorf de 1.5ml lo siguiente:

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/estándar	-	10µl
Agua destilada	10µl	-
Reactivo	1000µl	1000µl

2. Incubar 10 min a 37°C.
3. Leer la absorbancia dentro de 60min contra el blanco.
4. Calcular la concentración de cada muestra con base a la absorbancia y concentración del estándar de triglicéridos.

ANEXO V – Medición de colesterol en suero

Determinación cuantitativa *In vitro* de colesterol en suero con el reactivo colesterol FS en equipo fotométrico.

1. Añadir en tubos eppendorf de 1.5ml lo siguiente:

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/estándar	-	10µl
Agua destilada	10µl	-
Reactivo	1000µl	1000µl

2. Incubar 10 min a 37°C.
3. Leer la absorbancia dentro de 60min contra el blanco.
4. Calcular la concentración de cada muestra con base a la absorbancia y concentración del estándar de colesterol.

ANEXO VI – Extracción de proteína con Buffer de lisis RIPA y cuantificación

a) EXTRACCION

SOLUCION RIPA		ml de solución						
		10	50	100	150	200	250	500
PBS 1X	ml	9.9	49.9	99	149	198	248	495
NP-40 al 1%	ml	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	5
Deoxicolato de sodio al 0.5%	g	0.05	0.25	0.5	0.75	1	1.25	2.5
SDS 0.1%	g	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.5
Azida de sodio al .006%	g	0	0	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03

- Filtrar y guardar a 4°C protegida de la luz.
- Al momento de usar, agregar 1 pastilla de inhibidores de proteasas por cada 10ml de RIPA.

1. En tubos Corex de 15ml poner 2ml de RIPA por cada 100-500mg de tejido (tubos en hielo).
2. Agregar aproximadamente .25g de tejido congelado a cada tubo.
3. Homogeneizar con Politron manteniendo el tubo en hielo.
4. Incubar en hielo por 30 min y dar vortex ocasionalmente.
5. Centrifugar (Rotor JA-20) a 12000 rpm por 15min a 4°C.
6. Tomar el sobrenadante y transferirlo a tubos eppendorf de 1.5ml.
7. Almacenar a -70°C.

b) CUANTIFICACION

Curva de diluciones

- * Utilizar un stock de albumina de 2mg/ml.
- * Preparar el Reactivo A+S: 20 µl Reactivo S por cada ml de reactivo A.
 1. Tomar 100µl del stock y vaciarlo en un tubo eppendorf.
 2. Transferir 50 µl de este a otro tubo y agregar los restantes 50 µl de agua.
 3. Continuar así diluyendo 3 veces más hasta tener 5 tubos con las siguientes concentraciones: 2 µl, 1 µl, .0.5 µl, 0.25 µl, 0.125 µl.
 4. Tomar 10 µl de cada tubo y transferirlo otro Eppendorf (hacer por duplicado)
 5. Agregar 50 µl de reactivo A + S y agitar.
 6. Agregar 400 µl de reactivo B y agitar.
 7. Dejar 15 min en oscuridad y leer en espectrofotómetro.

Preparación de muestras para cuantificar

1. Diluir 1:20 cada muestra con agua destilada.
2. Poner 10 µl de cada muestra por duplicado.
3. Agregar reactivos A+S y B en las cantidades ya descritas.
4. Dejar 15 min en oscuridad y leer espectrofotómetro.

ANEXO VII - Western Blot

a) PREPARACION DE GELES

1. Lavar vidrios con agua y etanol y secar con kimwipes.
2. Montar vidrios, checarlos con un poco de etanol o sellarlos con cinta.
3. Dibujar marcas a 2.5 cm a partir del vidrio corto.
4. Preparar el gel separador (ver ANEXO E), vaciarlo y adicionar etanol al 70 % frío para eliminar burbujas y “aplanarlo”, esperar a que polimerice (20 min).
5. Vaciar el etanol y secar el exceso con sanita o kimwipes.
6. Preparar gel concentrador al 4%, poner peine, esperar a que polimerice (20 min).
7. Quitar el peine, limpiar los pozos con agua desionizada.
8. Colocar los geles en la cámara y agregar buffer de corrida 1X.
9. Se pueden preparar uno o dos días antes, mantenerlos de preferencia a 4°C.

b) PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Adicionar al buffer de muestra Laemmli BioRad el β -mercapto (237.5 μ l:12.5 μ l), (475 μ l:25 μ l), (950 μ l:50 μ l). * dura como máximo 24 h
2. Mezclar la proteína con el buffer de muestra adicionado con β -mercapto en una proporción 1:1 como mínimo.
3. Estandarizar la concentración adecuada de proteína según el tejido y las condiciones (desde 20 μ g se detectan proteínas con alta sensibilidad), no poner un exceso.
4. Calentar las muestras 5 min a 80°C, después dejarlas en hielo.
5. Cargar las muestras en los carriles.
6. Poner el marcador de peso molecular directo en el gel (sin buffer de muestra), en los carriles vacíos poner sólo el buffer de muestra.

c) CORRIMIENTO DE GEL

1. Correr el gel a 75 V por 30 min para que las muestras se alineen en la parte inferior del gel concentrador.
2. Una vez alineadas, subir el voltaje a 100, dejar correr el gel por 1:30 min – 2:30 min dependiendo del peso molecular de la proteína a medir.

d) TRANSFERENCIA DEL GEL A MEMBRANA DE PVDF

1. Cortar membranas de PVDF 8 x 5 cm y cortar filtros 9.25 x 6.25 cm.
2. Preparar 120 ml de buffer de transferencia por membrana: por cada 80 ml de buffer de transferencia 1x adicionar 20 ml de metanol. Mezclarlos ese día mientras corre el gel y dejarlo enfriar a -20°C, no re-usar.
3. Una vez que el gel haya corrido lo suficiente, desmontar los vidrios, poner el vidrio chico hacia arriba, separar los vidrios con la ayuda de la espátula.
4. Cortar el gel concentrador y carriles no utilizados.
5. Sumergir las membranas de PVDF en metanol por 20 seg y después en agua destilada por 5 minutos para hacerlas hidrofílicas.

6. Sumergir por 30 minutos en buffer de transferencia/metanol frio los geles, las membranas y los filtros. Incubar a 4°C.
7. Limpiar con etanol el aparato de transferencia y poner:
Filtro → membrana PVDF → gel → Filtro
8. Transferir por 90 min a 9V o 35 min a 15V.

e) BLOQUEO

1. Preparar una solución de bloqueo al 1% con leche en polvo sin grasa o bien albúmina al 0.1% en TBSt.
2. Poner la membrana en un recipiente y cubrirla con solución de bloqueo.
3. Agitar suavemente (120 rpm) por 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavar las membranas por 5 min en solución de lavado 3 veces (150 rpm).

f) ANTICUERPO PRIMARIO

1. Agregar la solución de anticuerpo primario a las membranas.
* Para calcular los volumen de anticuerpo: volumen total de solución (µl)/dilución = volumen de anticuerpo (µl)
2. Agitar suavemente (3.5 vel) overnight a 4°C y posteriormente dejar 1 h a temperatura ambiente.
3. Lavar las membranas por 10 min en solución de lavado por 3 veces (8 vel)

g) ANTICUERPO SECUNADARIO

1. Agregar la solución de anticuerpo secundario en solución de bloqueo (1:3500 es adecuado).
2. Agitar suavemente (120rpm) por 1-2 horas a temperatura ambiente.
3. Enjuagar las membranas una vez, lavar las membranas por 10 min en solución de lavado por 3 veces (160rpm) y volver a enjuagar la membrana.

h) REVELADO

1. Agregar el revelador a las membranas, previamente colocadas en una superficie plana.
2. Esperar 4 minutos.
3. Escurrir las membranas y ponerlas dentro del casete de revelado
En cuarto oscuro con foco rojo:
4. Poner una placa de revelado (evitar moverla una vez que haya tenido contacto).
5. Sumergir la placa en el revelador (bajo la luz roja controlar el tiempo adecuado).
6. Sumergir la placa en agua para enjuagarla y luego en el fijador y dejarla ahí de 3 a 5 min.
7. Volver a enjuagar y dejar secar.

i) RE-USO DE LA MEMBRANA

1. Lavarla 3 veces con solución de lavado (TBSt) por 5 min.
2. Lavar por 20 min con TBS.
3. Hacer stripping si se quiere medir la misma proteína o una muy cercana.

ANEXO VII.1 – Preparación de geles para Western Blot

GEL SEPARADOR

Número de Geles	1	2	3	4	5	6	7	8
7%	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml	48 ml	56 ml	64 ml
Agua (ml)	4.00	8.00	12.01	16.01	20.01	24.01	28.01	32.02
Tris 1.5 M pH 8.8 (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10 % (µl)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30 % (ml)	1.87	3.74	5.61	7.48	9.35	11.22	13.09	14.96
APS 10 % * (µl)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMED * (µl)	8	16	24	32	40	48	56	64
8%	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml	48 ml	56 ml	64 ml
Agua (ml)	3.72	7.44	11.16	14.88	18.6	22.32	26.04	29.76
Tris 1.5 M pH 8.8 (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10 % (µl)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30 % (ml)	2.16	4.32	6.48	8.64	10.8	12.96	15.12	17.28
APS 10 % * (µl)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMED * (µl)	8	16	24	32	40	48	56	64
10%	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml	48 ml	56 ml	64 ml
Agua (ml)	3.21	6.42	9.63	12.84	16.05	19.26	22.47	25.68
Tris 1.5 M pH 8.8 (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10 % (µl)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30 % (ml)	2.67	5.34	8.01	10.68	13.35	16.02	18.69	21.36
APS 10 % * (µl)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMED * (µl)	8	16	24	32	40	48	56	64
12%	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml	48 ml	56 ml	64 ml
Agua (ml)	2.68	5.36	8.04	10.72	13.4	16.08	18.76	21.44
Tris 1.5 M pH 8.8 (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10 % (µl)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30 % (ml)	3.2	6.4	9.6	12.8	16	19.2	22.4	25.6
APS 10 % * (µl)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMED * (µl)	8	16	24	32	40	48	56	64
15%	8 ml	16 ml	24 ml	32 ml	40 ml	48 ml	56 ml	64 ml
Agua (ml)	1.88	3.76	5.64	7.52	9.4	11.28	13.16	15.04
Tris 1.5 M pH 8.8 (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10 % (µl)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30 % (ml)	4	8	12	16	20	24	28	32
APS 10 % * (µl)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMED * (µl)	8	16	24	32	40	48	56	64

* Adicionar al final para que la acrilamida polimerice

GEL CONCENTRADOR

	4.5	9	13.5	13.5	18	22.5	27	36
4%								
Agua (ml)	2.69	5.39	8.08	10.77	13.47	16.16	18.85	21.55
Tris 0.5 M pH 6.8 (ml)	1.13	2.25	3.375	4.5	5.625	6.75	7.875	9
SDS 10 % (µl)	45	90	135	180	225	270	315	360
Poliacrilamida 30 % (ml)	0.6	1.2	1.8	2.4	3	3.6	4.2	4.8
APS 10 % * (µl)	22.5	45	67.5	90	112.5	135	157.5	180
TEMED * (µl)	9	18	27	36	45	54	63	72

ANEXO VII.2 – Soluciones para Western Blot

Poliacrilamida al 30%

	ml				
	25	50	100	150	200
Acrilamida (g)	7.3	14.6	29.2	43.8	58.4
Bisacrilamida (g)	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6
Nota:	Usar guantes y cubrebocas al pesar. Disolver en la mitad del volumen final. Filtrar y guardar en frasco ambar a 4°C				

Tris 1.5 M pH 8.8 (gel separador)

	MI			
	50	100	150	200
Tris base (g)	9.075	18.15	27.23	36.3
Nota:	Disolver en la mitad del volumen final, ajustar el pH. Guardar a 4°C			

Tris 0.5 M pH 6.8 (gel concentrador)

	MI			
	50	100	150	200
Tris base (g)	3	6	9	12
Nota:	Disolver en la mitad del volumen final, ajustar el pH. Guardar a 4°C			

SDS 10%

	MI			
	50	100	150	200
SDS (g)	5	10	15	20
Nota:	Usar cubrebocas grueso. Disolver en la mitad del volumen final. Guardar a TA			

Persulfato de amonio 10% (APS)

	MI			
	1	2.5	5	10
APS (g)	0.1	0.25	0.5	1
Nota:	Alicuotar. Guardar a -20°C			

Buffer de Corrida 10X

	Litros			
	0.5	1	1.5	2
Tris base (g)	15	30	45	60
Glicina (g)	72.4	144.8	217.2	289.6
SDS (g)	5	10	15	20
Nota:	Ajustar el pH a 8.3, pero nunca se ajusta. Guardar a 4°C			

Buffer de transferencia 5X

	Litros			
	0.5	1	1.5	2
Tris base (g) 60 mM	18.1875	36.375	54.5625	72.75
Glicina (g) 40 mM	9.1562	18.3125	27.4687	36.625
SDS (g) 0.04%	0.1171	0.2343	0.3514	0.4686
Nota:	Guardar a 4°C			

TBS 10X

	Litros			
	0.5	1	1.5	2
Tris base (g)	12.1	24.2	36.3	48.4
NaCl (g)	40	80	120	160
Nota:	Ajustar pH a 7.6 y después aforar. Guardar a 4°C			

Solución de lavado: TBS 1X – tween 0.1%

Por cada litro de TBS 1X agregar 1 ml de tween (mantenerla a TA mientras se usa, ir preparando con tween sólo lo necesario)

Solución Blotto: TBS 1X - tween 0.1% -leche 5%

TBS 1X –tween 0.1 % (ml)	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml	125 ml	150 ml	175 ml	200 ml	250 ml
Leche (g)	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	12.5

Ponceau S

	ml			
	50	100	150	200
Ponceau S 0.1% (g)	0.05	0.1	0.15	0.2
Ácido Acético 5% (ml)	2.5	5	7.5	10
Agua (ml)	47.5	95	142.5	190
Nota:	Guardar a TA protegido de la luz.			

NaOH 0.1 M

	ml			
	50	100	150	200
NaOH (g)	0.2	0.4	0.6	0.8
Nota:	Guardar a TA.			

Revelador

Hacer una dilución 1:5 del stock

Fijador

Hacer una dilución 1:5 del stock

ANEXO VII.3 – Condiciones para Western Blot

ANTICUERPO		IgG	#catalogo	Marca	Peso	[Ab1°]	[Ab2°]	[P]	Gel	Exposición	Bloqueo
SNAP	Anti-JNK/SAPK1	Rabbit (polyclonal)	06-748 (28133)	Millipore	54kDa	1:500	1:2500	100µg	10%	3 min	LECHE 1%
	SREBP-1c (K-10)	Rabbit (polyclonal)	Sc-367	Sta. Cruz	Precursor: 125kDa Maduro: 68kDa	1:100	1:2500	100µg	10%	5 min	
	PPARα (H-98)	Rabbit (polyclonal)	SC-9000	Sta. Cruz	55kDa	1:100	1:2500	150µg	10%	9 min	
	Anti IRS-1, clone 4.2.2	Mouse (monoclonal)	05-1085 (NG1627563)	Millipore	185kDa	1:400	1:2500	150µg	8%	20 min	
	TNFα	Rabbit (polyclonal)	AB1837P NMM1602734	Millipore		1:200	1:2500	200µg	15%	15 min	
WB	Anti-phospho-IRS1 (Tyr941)	Rabbit (polyclonal)	07-848 (DAM1598775)	Millipore	165kDa	1:1500	1:3500	100µg	8%	3 min	ALBUMINA 0.1%
WB	Anti-phospho-IRS1 (Ser 307 mouse/Ser 312 human) clone 24.6.2	Mouse (monoclonal)	05-1087	Millipore	185kDa	1:1500	1:3000	100µg	8%	1 min	
WB	pJNK (Thr183/Tyr185)	Goat (polyclonal)	SC-12882	Sta. Cruz	46kDa	1:1000	1:3500	100µg	10%	2 min	

WB	Actina	Goat (polyclonal)		Sta. Cruz	43kDa	1:1000	1:3000		1-3 min	LECHE 5%
SNAP						1:333	1:1000			LECHE 1%

ANEXO VII.4 – SNAP

a) SOLUCIONES Y VOLUMENES:

- Solución de bloqueo: 0.1% de leche en polvo sin grasa en TBS tween (TBSt)
- Volumen por pozo:

	Holder de 1 pozo	Holder de 2 pozos	Holder de 3 pozos
Solución de bloqueo	30ml/pozo	15ml/pozo	10ml/pozo
Solución de lavado	30ml/pozo	15ml/pozo	10ml/pozo
Anticuerpos	6ml /pozo	3ml/pozo	2ml/pozo

- Diluciones de anticuerpos: usar 3 veces más concentrado que en el WB tradicional.

b) PROCEDIMIENTO:

Los pasos anteriores al bloqueo son los mismos que con el WB tradicional. Después de la transferencia:

1. Sumergir la membrana 2 segundos en metanol y 5min en agua desionizada.
2. Mojar los holders con agua desionizada.
3. Colocar una membrana en cada holder (el lado con las proteínas hacia abajo) y utilizar el rodillo para eliminar burbujas.
4. Agregar el filtro a cada holder y volver a usar el rodillo, cerrar bien el holder y colocar en el SNAP.
5. Agregar la solución de bloqueo y dejar incubar 15 min.
6. Activar el vacío lentamente hasta que se filtre toda la solución.
7. Agregar el anticuerpo primario e incubar por 15 min.
8. Activar el vacío y dar 7 lavados con TBStween.
9. Agregar el anticuerpo secundario e incubar por 15 min.
10. Activar el vacío y dar 8 lavados con TBStween.
11. Sacar las membranas del holder, escurrir y proceder a revelar.

ANEXO VIII – Extracción de RNA con Tiocianato de Guanidina y Cloruro de Cesio

DIA 1

1. Limpiar el área de trabajo con etanol y DEPC.
2. Encender y ajustar las centrifugas.
 - Centrifuga: 15min, 18°C, 14000rpm
 - Ultracentrifuga: 18hrs, 18°C, 29000rpm
3. Colocar 6 camisas delgadas en el rotor de la centrífuga.
4. Colocar 40 tubos falcon en una gradilla y agregar agua DEPC a cada uno.
5. Colocar tubos Corex de 30ml en una gradilla y agregar 8ml de Tiocianato de guanidina con una pipeta estéril desechable.
6. Agregar 56µl de β mercaptoetanol a cada tubo (en la campana).
7. Tapar los tubos con papel aluminio y dejar en la campana.
8. Sacar tejidos del ultracongelador y ponerlos en nitrógeno líquido.
9. Depositar 500mg de tejido en cada tubo y homogeneizar con Politron (nivel 3 y previamente lavado x6) y lavar 6 veces más.
10. Agregar 400 µl de sarcosil 10% por la pared del tubo.
11. Mezclar por inversión 1 vez (tapar con parafilm).
12. Centrifugar 15min, 18°C, 14000rpm.
13. En tubos de polialómero, agregar 4ml de cloruro de cesio (no olvidar numerarlos).
14. Sacar los tubos de la centrífuga y tomar 8ml de sobrenadante y verter suavemente por las paredes del tubo de polialómero para no romper el gradiente.
15. Colocar las muestras en las camisas de la ultracentrifuga y atornillar la tapa.
16. Enganchar las camisas al rotor y revisar q estén bien fijadas.
17. Encender el vacío y centrifugar 18hr, 18°C a 29000rpm.

DIA 2

1. Apagar el vacío y retirar las muestras de la ultracentrifuga.
2. Destapar las camisas y extraer los tubos con una aguja.
3. Verter el sobrenadante en un vaso y dejar invertidos en una gradilla.
4. Cortar los tubos de polialómero a 2cms de la base con una navaja.
5. Disolver la pastilla con 300 µl de DEPC pipeteando suavemente.
6. Pasar a un tubo eppendorf y agregar otros 300 µl de DEPC.
7. Dar vortex hasta disolver la pastilla por completo.
8. Agregar 30 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 750 µl de etanol 100% frío.
9. Dar vortex y almacenar a -70°C por 24hrs.

DIA 3

1. Encender la microcentrifuga y ajustar 30min, 4°C, 14000rpm.
2. Sacar muestras del ultra y descongelar en hielo.
3. Centrifugar 30min, 4°C, 14000rpm.
4. Desechar etanol cuidando de no desprender la pastilla y dejar escurrir por inversión.
5. Añadir 1ml de etanol 70% frío y dar vortex hasta desprender la pastilla.
6. Centrifugar 15min, 4°C, 14000rpm.
7. Tirar el etanol y secar el borde del tubo.
8. Re suspender con 500 µl el DEPC y dar vortex hasta disolver completamente
9. Almacenar a -70°C

ANEXO VIII.1 – Reactivos para extracción de RNA

- **Tiocianato de Guanidina**

Tiocianato de Guanidina	236.32g
Citrato de sodio 1M, pH 7	12.5ml
Agua DEPC	Aforar a 500ml

No mezclar, calentar a baño maría por 30min a 40°C y enfriar en hielo. Esterilizar por filtración de membrana de nylon 0.22µm y guardar a 4°C.

- **Cloruro de Cesio**

Cloruro de cesio	230g
Acetato de sodio 3M, pH 5.2	2ml
Agua DEPC	Aforar a 250ml

Esterilizar por filtración de membrana de nylon 0.22µm y guardar a temperatura ambiente.

- **Acetato de sodio 3M**

Acetato de sodio	20.415g
Agua DEPC	Aforar a 50ml

Esterilizar por filtración de membrana de nylon 0.22µm y guardar a temperatura ambiente.

- **Lauril Sarcosina 10%**

N-Lauroilsarcosina sal de sodio	10g
Agua DEPC	Aforar a 100ml

Mezclar por 1 hora o hasta que se disuelva y dejar reposar 15min. Esterilizar por filtración de membrana de nylon 0.22µm y guardar a temperatura ambiente.

ANEXO IX – Cuantificación de RNA

- Se mide la absorbancia a 260nm por espectrofotometría.
 1. Incubar la muestra de RNA a 65°C por 5min.
 2. Agregar 4µl de la muestra de RNA a un eppendorf nuevo.
 3. Agregar 996 µl buffer TE pH7.5.
 4. Mezclar por vortex ligeramente y leer a 260 y 280nm en celdas de cuarzo.
- Para corroborar la pureza del RNA, se obtiene la relación 260/280nm que debe ser entre 1.9 y 2.2.
- Después se calcula la concentración de RNA de la siguiente manera:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ D.O.} & \text{—————} & 40 \mu\text{g de RNA} \\ \text{D.O. muestra} & \text{——} & x \mu\text{g de RNA} \end{array}$$

- Se ajusta a la concentración deseada para correr la electroforesis

ANEXO IX.1 - Reactivos para cuantificación de RNA

Buffer TE

1. Pesar 4.576g de tris-HCl y llevarlo a 900ml con agua desionizada
2. Agregar 2.5ml de EDTA 0.4M pH 8
3. Ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000ml

Agua DEPC

1. 3ml de dietilpircarbonato aforar a 3000ml con agua desionizada
2. Colocar en agitación por 4hrs
3. Autoclave: 15min/ 15lg/plg2
4. Horno: 180°C por 4hrs

ANEXO X – Electroforesis de RNA

a) PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA 1.5%

1. Lavar la cámara de electroforesis, el peine y la caja con DEPC. Colocarlos en la campana y equilibrar.
2. Pesar 1.5g de agarosa grado biología molecular en papel aluminio y agregar a un matraz.
3. Medir 72ml de DEPC y agregar al matraz.
4. Disolver calentando en microondas y agitando.
5. Dejar enfriar a 50°C y agregar 10ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehido.
6. Vaciar en la caja y dejar solidificar 1 hora.
7. Cubrir con plástico hasta que las muestras estén listas.

b) PREPARACION DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS

1. Calentar el RNA a 65°C por 5min.
2. Suspender el RNA en agua estéril a una concentración de 7.5µg/µl y en hielo.
3. En tubos eppendorf nuevos agregar:

MOPS 10X	2 µl
Formaldehido	4 µl
Formamida	10 µl
Bromuro de etidio	1 µl
RNA total (7.5µg/µl)	2 µl
4. Dejar incubando la reacción 10 min a 75°C.

c) CARGADO Y CORRIMIENTO DEL GEL

1. Llenar cámara de electroforesis con MOPS 1x frío hasta 1mm por arriba del gel.
2. Pre correr el gel 5min a 95volts.
3. Sacar las muestras y enfriar en hielo por 10min y dar un spin.
4. Añadir 2 µl de Loading Buffer a cada tubo, mezclar por pipeteo y regresar al hielo.
5. Cargar las muestras y correr 2.5hrs a 95volts.

d) FOTOGRAFÍA DEL GEL

Se visualiza el gel en el transluminador sobre plástico adherible y se toma una foto (Kodak, Digital Imaging). Se debe observar la banda 28S dos veces más brillante que la 18S en RNA no degradado.

ANEXO XI – RT por MMuLV

Colocar en hielo los reactivos y soluciones:

- Buffer RT 5x
 - dNTPs 2mM
 - Oligo dT (1:5)
 - DTT 0.1M
 - Agua estéril
 - RNA total
1. Colocar los tubos eppendorf en una gradilla y rotular.
 2. Encender el termociclador.
 3. Agregar el agua estéril y RNA a cada tubo:
 - 5 µg de RNA en un volumen de 3.75µl.
 4. Preparar el Mix con los demás reactivos en un tubo eppendorf de 1.5ml con el volumen para el número de reacciones más 1.
 5. Agregar el Mix a cada tubo con RNA.
 6. Correr en el programa del termociclador (42°C 1 hora, 95°C 5min, 4°C 10min).

PREPARACIÓN DEL MIX

1. Descongelar y dar vortex a los reactivos.
2. Añadir al tubo, mezclando por pipeteo:

Reactivo	Por reacción (µl)
Buffer de RT 5x	4
Mezcla de dNTPs	4
Oligo dT	2
DTT	2

3. Sacar las enzimas del refrigerador y NO agitar. Agregar al Mix pipeteando suavemente:

Inhibidor de RNasas	1
RT (M-MuLV)	0.5

ANEXO XII – PCR tiempo real por Taq DNA polimerasa

Colocar en hielo los reactivos y soluciones:

- Buffer PCR (10x)
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 10mM
- Upper y lower primers 20μM
- Agua DEPC
- Producto de RT → cDNA

1. Encender el termociclador.
2. Preparar una mezcla con el número de reacciones más 1 en un tubo eppendorf.
3. Cada reactivo se descongela, se mezcla por vortex y se deposita en el fondo del tubo, pipeteando para mezclar.

Reactivo	Por reacción (μl)
Buffer PCR (10x)	2.5
MgCl ₂ 25mM	1.5
dNTPs 10mM	1
Upper primer	1
Lower primer	1
Agua DEPC	15.5

4. Sacar la enzima del refrigerador SIN AGITAR y se deposita en el fondo del tubo, pipeteando para mezclar y se devuelve al refrigerador.

Reactivo	Por reacción (μl)
Taq DNA polimerasa	0.5

5. Agregar el cDNA mezclando por pipeteo.

Reactivo	Por reacción (μl)
Producto de RT → cDNA	2

VOLUMEN FINAL: 25μl

6. Se programa el equipo y se corren los programas de la siguiente manera:

Programa	#ciclos	descripción
6	1	95°C 5min; TA 1min: 72°C 1min 30seg
7	33	95°C 1min; TA 1min: 72°C 1min 30seg
8	1	95°C 1min; TA 1min: 72°C 7min 30seg
9	-	4°C