



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Efecto del aceite de coco sobre la expresión de los genes de PPAR γ y neuropéptido Y, en un modelo de síndrome metabólico

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Esteban González Romero

Asesores:

Dra. Rosa María Oliart Ros

Dra. Carolina Peña Montes

Revisores:

Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz

Dr. Víctor José Robles Olvera

Dr. Mario Ramírez Lepe

H. Veracruz Ver.

Junio, 2017.

Resumen

Las dos principales causas de muerte en México son: enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus y están relacionadas con el síndrome metabólico (SMe) ⁽¹⁾. Existen tratamientos farmacológicos y no farmacológicos para el tratamiento del SMe; dentro de los no farmacológicos se encuentran modificaciones en la ingesta de ácidos grasos omega 6 y 3 en especial el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) que, junto con una buena alimentación y ejercicio, ayudan a contrarrestar el SMe. Los triacilglicéridos de cadena media (MCT) han demostrado tener un efecto benéfico en el control del sobrepeso, obesidad, glucosa elevada, presión arterial elevada y el metabolismo de lípidos, en comparación con dietas ricas en ácidos grasos de cadena larga (LCT) ⁽²⁾ ⁽³⁾. El aceite de coco es una fuente de MCT, 50 % de ácido láurico (C12:0) ⁽⁴⁾. Al aceite virgen de coco, se le han atribuido mayores propiedades benéficas para la salud, contiene tocoferoles, fitoesteroles y polifenoles en mayor proporción que otras presentaciones del aceite ⁽⁵⁾.

El PPAR γ (receptor activado proliferador peroxisomal gamma) es un factor transcripcional asociado a adipogénesis y lipogénesis, y promueve la expresión de genes para la producción y sensibilidad a la insulina (6) (7) (8). Por otra parte el neuropéptido Y (NPY), es un importante neurotransmisor en la regulación del apetito, entre otros (9) (10) (11). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del aceite de coco (virgen y refinado) sobre el síndrome metabólico en un modelo inducido por fructosa y evaluar su impacto en la expresión de PPAR γ y neuropéptido Y.

Se utilizaron ratas Wistar macho a las que se les indujo el SMe por la administración de fructosa al 30 % en el agua de bebida durante 15 semanas. Después se administró por vía intragástrica una mezcla de aceite de maíz-canola (MC) , aceite de coco virgen (VCO), aceite de coco refinado (RCO) y suplemento de aceite de alga (SAA, rico en EPA y DHA n-3) durante seis semanas. Al término del tratamiento se

evaluaron diversos parámetros referentes al síndrome metabólico y se midió la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y el apetito.

Con el aceite VCO se obtuvieron resultados que demuestran un efecto benéfico sobre el SMe: disminución de glucosa 28 %, tejido adiposo epididimal 11%, triacilglicéridos 34 %; aumento de sensibilidad a insulina 18 %. Los resultados son comparables con los obtenidos con SAA. Además, el SAA indujo la expresión del gen de PPAR γ (163 % en hígado, 187 % en adiposo) y el VCO indujo la expresión del NPY (142 %), lo que puede estar influenciando beneficios sobre el SMe.

CONTENIDO

RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	VIII
ANTECEDENTES.....	1
1.1 SÍNDROME METABÓLICO	1
1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA.....	2
1.3 ACEITE DE COCO	4
1.4 TRIGLICÉRIDOS DE CADENA MEDIA.....	5
1.5 EFECTO DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA EN MODELOS MURINOS.....	6
1.6 ADIPOGÉNESIS.....	7
1.6.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	8
1.7 REGULACIÓN DEL APETITO	10
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
HIPÓTESIS	15
METODOLOGÍA.....	16
2.1 DIAGRAMA GENERAL	16
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	17
2.3 DIETA EXPERIMENTAL	17
2.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	18
2.4.1 Extracción de lípidos método de Folch	18
2.4.2 Metilación de ácidos grasos.....	19
2.4.3 Extracción de fitoesteroles	19
2.4.4 Análisis de ésteres metílicos mediante GC-MS.....	20
2.4.5 Método fitoesteroles en cromatógrafo.....	21
2.5 CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA E INSULINA	21
2.6 PARÁMETROS SÉRICOS RELATIVOS AL SÍNDROME METABÓLICO	22
2.6.1 Determinación de glucosa.....	22
2.6.2 Determinación de colesterol	23
2.6.3 Determinación de triacilglicéridos	23
2.6.4 Determinación de ácido úrico	24
2.6.5 Determinación de creatinina.....	25
2.6.6 Determinación de urea.....	26
2.6.7 Determinación de albumina.....	27
2.7 EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR	27
2.7.1 Método de Ct comparativo	28
2.7.2 Curva estándar para eficiencia	29
2.7.3 Extracción de RNA.....	30
2.7.4 Purificación y conversión de RNA a cDNA	30
2.7.5 Expresión de NPY y PPARγ.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 ANÁLISIS CROMATOGRAFICO DE ACEITES.....	34
3.1.1 Mezcla de aceite de Maíz y canola (MC).....	34
3.1.2 Aceite de coco (VCO y RCO).....	36
3.1.3 Suplemento de aceite de alga	37

3.2 ANÁLISIS EXPERIMENTAL.....	38
3.3 ANÁLISIS DE INDUCCIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO 14 SEMANAS	41
3.4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y TEJIDOS	44
3.5 RESULTADOS DE ANÁLISIS SÉRICOS AL FINAL DEL EXPERIMENTO.....	49
3.6 CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA E INSULINA.....	55
3.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE PPAR γ Y NPY	59
3.7.1 Expresión de PPAR γ en hígado.....	59
3.7.2 Expresión de PPAR γ en tejido adiposo epididimal.....	60
3.7.3 Expresión de NPY en hipotálamo	61
3.8 DISCUSIÓN GENERAL.....	63
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
4.1 CONCLUSIONES.....	65
4.2 RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	73
<i>Cromatogramas de perfil de ácidos grasos.....</i>	<i>73</i>
<i>Cromatogramas para cuantificación de fitoesteroles.....</i>	<i>75</i>
<i>Emulsión de aceites.....</i>	<i>78</i>
<i>Recolección de muestras.....</i>	<i>78</i>
<i>Resultados de RNA.....</i>	<i>80</i>
<i>Geles de agarosa.....</i>	<i>82</i>
<i>Curvas de eficiencia para RT-PCR.....</i>	<i>85</i>
<i>Aceites y suplementos utilizados.....</i>	<i>89</i>

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME METABÓLICO ⁽¹²⁾	2
TABLA 2. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE COCO ⁽⁴⁾	4
TABLA 3. NIVELES DE TOCOFEROL Y FITOESTEROLES EN ACEITE VCO Y ACEITE COPRA (CO) ⁽⁵⁾	5
TABLA 4. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITE MC.....	35
TABLA 5. CONTENIDO DE FITOESTEROLES EN ACEITE MC, EXTRAÍDOS DE 100 MG DE ACEITE.....	35
TABLA 6. CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS DOS ACEITES DE COCO (VCO Y RCO).....	36
TABLA 7. FITOESTEROLES EXTRAÍDOS DE LA PARTE NO SAPONIFICABLE DE LOS ACEITES DE COCO.....	37
TABLA 8. ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE ALGA CONTENIDOS EN SAA.....	37
TABLA 9. PRINCIPALES FITOESTEROLES EN 100 MG DE ACEITE EXTRAÍDO DEL SAA	38
TABLA 10. RESUMEN DE RESULTADOS CONCERNIENTES AL SME.....	63
TABLA 11. LECTURAS DE CONCENTRACIÓN DE RNA, EXTRAÍDO DE TEJIDO ADIPOSO	80
TABLA 12. LECTURAS DE CONCENTRACIÓN DE RNA, EXTRAÍDO DE HÍGADO	81
TABLA 13. LECTURAS DE CONCENTRACIÓN DE RNA, EXTRAÍDO DE HIPOTÁLAMO	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE EN MÉXICO EN 2012 ⁽¹⁾	1
FIGURA 2. RUTA DE GLICERONEOGÉNESIS A PARTIR DE PIRUVATO ⁽¹⁸⁾	3
FIGURA 3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA CASCADA ADIPOGÉNICA. ⁽²⁷⁾	8

FIGURA 4. INHIBICIÓN DE PPAR γ POR MCT Y LA SAL DECANOATO, EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y PREADIPOCITOS ⁽²⁾	9
FIGURA 5. MECANISMO PROPUESTO PARA LA INHIBICIÓN DE LIPOGÉNESIS EN EL ADIPOCITO ⁽²⁾	10
FIGURA 6. REGULACIÓN DEL APETITO EN EL NÚCLEO ARQUEADO Y PAPEL DEL NEUROPEPTIDO Y ⁽¹⁰⁾	12
FIGURA 7. DIAGRAMA GENERAL DE METODOLOGÍA	16
FIGURA 8. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACIÓN DE MC, VCO, RCO Y SAA EN UN MODELO DE SME	17
FIGURA 9. REACCIÓN DE JAFFÉ ⁽⁴⁷⁾	25
FIGURA 10. PROGRAMA EN EL TERMOCICLADOR DEL EQUIPO	33
FIGURA 11. ALIMENTO CONSUMIDO EN PROMEDIO POR CADA ANIMAL DEL GRUPO EN UNA SEMANA	39
FIGURA 12. CONSUMO EN Kcal APORTADAS POR CROQUETA, FRUCTOSA Y ACEITE O SUPLEMENTO	40
FIGURA 13. PROMEDIO DEL PESO DEL GRUPO SEMANA A SEMANA	41
FIGURA 14. GLUCOSA A 14 SEMANAS DE EXPERIMENTO	42
FIGURA 15. COLESTEROL A 14 SEMANAS DE EXPERIMENTO	43
FIGURA 16. TRIACILGLICÉRIDOS A 14 SEMANAS DE EXPERIMENTO.....	44
FIGURA 17. PORCENTAJE DE PESO DEL HÍGADO RESPECTO AL PESO DEL ANIMAL EXPERIMENTAL	46
FIGURA 18. PORCENTAJE DE PESO DEL TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL RESPECTO AL PESO DEL ANIMAL EXPERIMENTAL	46
FIGURA 19. PORCENTAJE DE PESO DEL TEJIDO ADIPOSO INTERCOSTAL RESPECTO AL PESO DEL ANIMAL EXPERIMENTAL	47
FIGURA 20. PORCENTAJE DE PESO DEL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL RESPECTO AL PESO DEL ANIMAL EXPERIMENTAL.....	47
FIGURA 21. PORCENTAJE DE PESO DEL TEJIDO ADIPOSO EPICÁRDICO RESPECTO AL PESO DEL ANIMAL EXPERIMENTAL	48
FIGURA 22. PORCENTAJE DE LA SUMA DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS RECOLECTADOS CON RESPECTO AL SUJETO EXPERIMENTAL	48
FIGURA 23. RESULTADOS GLUCOSA AL FINAL DEL EXPERIMENTO	49
FIGURA 24. RESULTADOS DE COLESTEROL AL FINAL DEL EXPERIMENTO	50
FIGURA 25. RESULTADOS DE TRIACILGLICÉRIDOS AL FINAL DEL EXPERIMENTO	51
FIGURA 26. RESULTADOS DE ÁCIDO ÚRICO AL FINAL DEL EXPERIMENTO	52
FIGURA 27. RESULTADOS DE ALBUMINA AL FINAL DEL EXPERIMENTO	53
FIGURA 28. RESULTADOS DE CREATININA AL FINAL DEL EXPERIMENTO	54
FIGURA 29. RESULTADOS DE UREA AL FINAL DEL EXPERIMENTO	55
FIGURA 30. CURVAS DE TOLERANCIA A LA INSULINA	56
FIGURA 31. ÁREA BAJO LA CURVA DE CTI	57
FIGURA 32. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.....	58
FIGURA 33. ÁREA BAJO LA CURVA DE CTG	59
FIGURA 34. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE PPAR γ EN HÍGADO	60
FIGURA 35. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE PPAR γ EN TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL	61
FIGURA 36. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE NPY EN HIPOTÁLAMO	63
FIGURA 37. CROMATOGRAMA DE ACEITE MC.....	73
FIGURA 38. CROMATOGRAMA DE ACEITE DE VIRGEN DE COCO	74
FIGURA 39. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EXTRAÍDO DE SUPLEMENTO SAA.	75
FIGURA 40. CROMATOGRAMA DE PARTE NO SAPONIFICABLE DE MEZCLA MC.....	76
FIGURA 41. CROMATOGRAMA DE PARTE NO SAPONIFICABLE DE VCO.....	76
FIGURA 42. CROMATOGRAMA DE PARTE NO SAPONIFICABLE DE RCO.....	77
FIGURA 43. CROMATOGRAMA DE PARTE NO SAPONIFICABLE DE SAA	77
FIGURA 44. FOTOGRAFÍA DE UNA RATA DEL EXPERIMENTO ANTES DE RECOLECTAR LOS ÓRGANOS.....	78
FIGURA 45. HÍGADO ANTES DE CONGELAR EN NITRÓGENO LÍQUIDO.....	79
FIGURA 46. CEREBRO ANTES DE EXTRAERLE EL HIPOTÁLAMO.....	79
FIGURA 47. MORTERO DE ACERO PARA TRITURAR ORGANOS.....	80
FIGURA 48. MUESTRAS DE RNA EXTRAÍDO DEL HIPOTÁLAMO	82
FIGURA 49. MUESTRAS DE RNA EXTRAÍDO DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL.....	83
FIGURA 50. MUESTRAS DE RNA EXTRAÍDO DE HÍGADO.....	83
FIGURA 51. PCR DE B ACTINA, NTC DE B ACTINA, PPAR γ , NTC DE PPAR γ Y MARCADOR.....	84
FIGURA 52. NTC DE B ACTINA, B ACTINA, NTC DE NPY Y GEN NPY.....	85
FIGURA 53. CURVA DE EFICIENCIA PARA B-ACTINA	86
FIGURA 54. MELT CURVE DE LA CURVA DE EFICIENCIA DE B- ACTINA	86
FIGURA 55. CURVA DE EFICIENCIA PARA PPAR γ	87

FIGURA 56. MELT CURVE DE LA CURVA DE EFICIENCIA DE PPARF.....	87
FIGURA 57. CURVA DE EFICIENCIA PARA NPY	88
FIGURA 58. MELT CURVE DE LA CURVA DE EFICIENCIA DE NPY	88
FIGURA 59. ACEITES UTILIZADOS PARA ADMINISTRAR AL GRUPO SME MC	89
FIGURA 60. ACEITE VIRGEN DE COCO	90
FIGURA 61. ACEITE REFINADO DE COCO.....	91
FIGURA 62. SUPLEMENTO DE ACEITE DE ALGA.....	92
FIGURA 63. COMPOSICIÓN DEL SUPLEMENTO DE ACEITE DE ALGA	93
FIGURA 64. EQUIPO STEP ONE DE APPLIED BIOSYSTEMS.....	94
FIGURA 65. CROMATÓGRAFO DE GASES 7820A (G4350A)	95

INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SMe), ha tenido diferentes nombres y criterios para su diagnóstico, sin embargo en los últimos años la prevalencia de este diagnóstico ha aumentado, es por eso que en el 2009 la Federación Internacional de Diabetes (IDF), la asociación americana del corazón (AHA), Instituto Nacional del corazón, sangre y pulmones (NHLBI), la Federación mundial del corazón y la Asociación Internacional para el estudio de la obesidad, propusieron una definición armonizada para el diagnóstico del SMe. ⁽¹²⁾

Debido al descubrimiento de los ácidos grasos esenciales, por George y Mildred Burr en 1929 y tiempo después del conocimiento que estos AGE son precursores de nuevos ácidos grasos poliinsaturados ⁽¹³⁾. Se consideró que los ácidos grasos poliinsaturados conllevan un mayor beneficio en comparación a los ácidos grasos saturados, relevando el interés de los ácidos grasos saturados para uso alimentario.

En estudios recientes se ha encontrado que el consumo de ácidos grasos de cadena media ayuda en la disminución de tejido adiposo. Lo que ha hecho, al aceite de coco con su alto contenido de ácidos grasos saturados de cadena media, un posible candidato para el estudio, al cual se le están atribuyendo efectos benéficos para la salud.

En la revisión bibliográfica se ha encontrado que las ratas a las que se les suplementa su dieta con aceite de coco, ingieren una menor cantidad de alimento, es por eso que se propone medir la expresión de genes relacionados con el apetito, al igual que algunos genes relacionados con la adipogénesis y lipogénesis que se ha encontrado que pueden ser inhibidos por los ácidos grasos de cadena media.

ANTECEDENTES

En el 2013 en México las dos principales causas de muerte fueron las enfermedades cardiovasculares y Diabetes mellitus, ⁽¹⁾ que al sumar las causas resulta en un 33 %. Estas enfermedades junto con enfermedades del hígado y cerebrovasculares pueden estar relacionadas con el síndrome metabólico. A nivel mundial las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte. ⁽¹⁴⁾

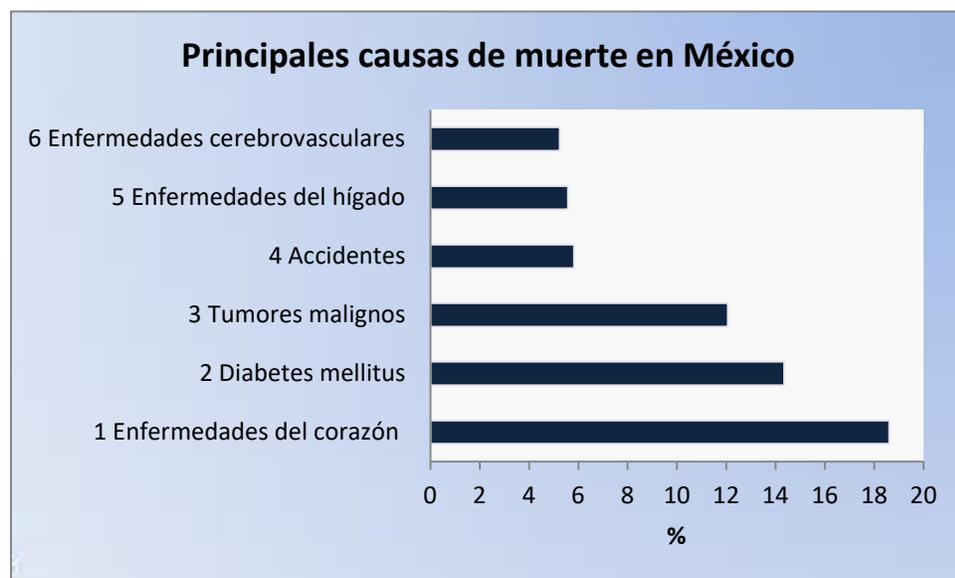


FIGURA 1. Principales causas de muerte en México en 2012 ⁽¹⁾

1.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es una compilación de factores de riesgo que predisponen al desarrollo de enfermedades como Diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, etc.

El síndrome metabólico fue descrito por primera vez en 1988, ⁽¹⁵⁾ y ha tenido múltiples definiciones desde entonces. En un esfuerzo conjunto de varias organizaciones (Organización Mundial de la Salud, Federación Internacional de la diabetes, Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, Asociación americana del

corazón, Federación Mundial del Corazón, Sociedad Internacional de Aterosclerosis, Asociación Internacional para el estudio de la Obesidad) se propuso un diagnóstico armonizado del síndrome metabólico ⁽¹²⁾. Donde poseer tres de los cinco factores de riesgo de la tabla 1, son causa de diagnóstico del síndrome metabólico.

TABLA 1. Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico ⁽¹²⁾

Parámetros	Puntos límite característicos
Circunferencia abdominal	Parámetros específicos para países y poblaciones
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL	Men < 40 mg/dL Women < 50 mg/dL
Presión arterial	≥ 130/ ≥85
Glucosa en ayuno	≥ 100 mg/dL

En este esfuerzo conjunto realizado por diversas organizaciones se trató de realizar un diagnóstico eficiente de la presencia del síndrome metabólico, aunque existen otros parámetros para diagnosticar el síndrome metabólico estos cinco son fáciles de medir y están relacionados directamente con la presencia del SMe.

Diversos factores contribuyen al desarrollo del SMe factores genéticos, estilo de vida, obesidad y resistencia a la insulina, todos juegan un papel importante en el desarrollo de SMe ⁽¹⁶⁾.

1.2 Resistencia a la insulina

Shulman en el 2000, sugiere el aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres induce la resistencia a la insulina, debido a la inhibición de transporte y fosforilación de glucosa; por la reducción de la síntesis de glucógeno en el músculo y la oxidación de glucosa ⁽¹⁷⁾.

Un buen balance en la gliceroneogénesis en el hígado y tejido adiposo, conlleva a una menor tasa de ácidos grasos libres que interfieren con la insulina provocando resistencia a la insulina. En el tejido adiposo una menor tasa de gliceroneogénesis conlleva a una mayor liberación de ácidos grasos libres y en el hígado una mayor tasa de gliceroneogénesis conduce a la síntesis y exportación de triacilglicéridos ⁽¹⁸⁾.

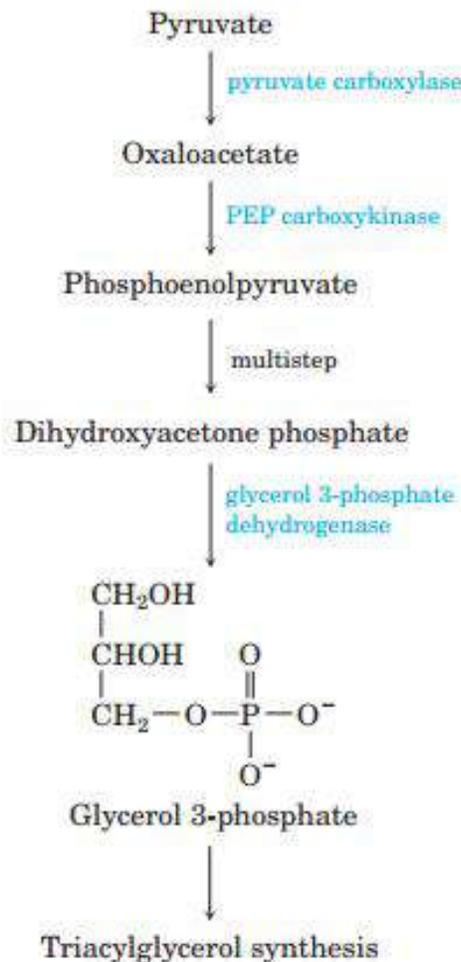


FIGURA 2. Ruta de gliceroneogénesis a partir de piruvato ⁽¹⁸⁾

El PPAR γ induce la expresión de genes de enzimas relacionadas con gliceroneogénesis, como la piruvato carboxilasa comprobado en células preadipocitarias 3T3-L1 y ratones con el gen PPAR γ 2 Knock-out⁽¹⁹⁾.

1.3 Aceite de coco

El aceite de coco es rico en ácidos grasos saturados, que se han relacionado con enfermedades cardiovasculares, creando una mala reputación del aceite de coco, sin embargo la mayoría de los ácidos grasos saturados que contiene el aceite de coco son ácidos grasos de cadena media⁽⁴⁾. Conteniendo aproximadamente un 50 % de ácido láurico, tabla 2.

El aceite de coco se puede encontrar en diferentes presentaciones, dependiendo el método de extracción y los procesos a los que lo han sometido. Algunas de ellas son: aceite virgen de coco (VCO), aceite copra (CO) y aceite refinado de coco (RCO).

TABLA 2. Composición de ácidos grasos del aceite de coco⁽⁴⁾

Aceite de coco	
Ácido graso	%
C6:0	ND-0.7
C8:0	4.6- 10.0
C10:0	5.0-8.0
C12:0	45.1-53.2
C14:0	16.8-21.0
C16:0	7.5-10.2
C18:0	2.0-4.0
C18:1	5.0-10.0
C18:2	1.0-2.5
C18:3	ND-0.2
C20:0	ND-0.2
C20:1	ND-0.2

El VCO, es el aceite al que se le han atribuido mayores propiedades benéficas, esto puede ser debido a un mayor contenido de antioxidantes y polifenoles ⁽²⁰⁾ ⁽⁵⁾ comparado con los otros aceites de coco.

Marina en 2009, encuentra que las propiedades químicas del VCO son igual de buenas que el RCO, con el beneficio que el VCO contiene un mayor contenido de compuestos fenólicos que le confieren una mayor capacidad antioxidante de hasta un 80 %, mientras que el RCO presenta solo un 50 %. El tocoferol y BHA se utilizaron como estándar y presentaron un 94 % y 84 % respectivamente ⁽²¹⁾.

TABLA 3. Niveles de tocoferol y fitoesteroles en aceite VCO y aceite copra (CO) ⁽⁵⁾

	VCO	CO
Vitamina E µg/100 g	30.87 ± 0.70	12.76 ± 0.26
Campesterol ng/100 mg	17.29 ± 0.29	25.07 ± 0.13
Estigmasterol ng/100 mg	63.13 ± 0.19	57.05 ± 0.13
β-Sitosterol ng/100 mg	73.03 ± 0.26	57.00 ± 0.29

Existen estudios donde se observan efectos benéficos del aceite de coco, como de triglicéridos de cadena media (MCT), comparados con triglicéridos de cadena larga (LCT) mayormente.

1.4 Triacilglicéridos de cadena media

Existen en el mercado aceites con MCT, que llevan este nombre por el alto contenido de ácidos grasos de cadena media. Los ácidos grasos de cadena media, abarcan los ácidos grasos de 6, 8, 10 y 12 carbonos.

La mayoría de los estudios que se encuentran disponibles son realizados utilizando aceites comerciales que contienen ácidos grasos de 8 y 10 carbonos encontrando efectos interesantes en modelos de ratas sanas y ratas con algún desorden metabólico como hipertensión y diabetes.

Estudios como el de Turner 2009, donde administró a ratas Wistar macho sanas aceite de coco hidrogenado como fuente de ácidos grasos de cadena media, y manteca de cerdo como fuente ácidos grasos de cadena larga. Obtuvo que las ratas alimentadas con aceite de coco hidrogenado disminuyeran su masa corporal, tejidos adiposos, glucosa y triglicéridos en plasma, así como aumento de triglicéridos en el hígado y disminución de triglicéridos en el musculo comparados con las ratas alimentadas con manteca ⁽²²⁾.

1.5 Efecto de ácidos grasos de cadena media en modelos murinos

Los artículos encontrados sobre los efectos de los ácidos grasos de cadena media se han basado en modelos de ratas o ratones sanos o con algún factor del SME alterado.

Han en 2003, administró a ratas Sprague-Dawley sanas una dieta con 20 g de grasa, proveniente de aceite de MCT (C8 71 % y C10 26 %) y LCT (C16 11 %, C18:1 30 % y C18:2 59 %) obteniendo que el grupo alimentado con MCT obtuvo una menor ganancia de masa corporal; así como un menor peso de los tejidos adiposos ⁽²⁾.

Takeuchi en 2006, administró en la comida a ratas Wistar macho sanas aceite de colza como fuente de LCT y aceite MCT comercial por 8 semanas obteniendo una menor ganancia de peso, menor peso de tejidos adiposo, disminución de glucosa y leptina en las ratas alimentadas con aceite MCT comparadas con las ratas alimentadas con aceite de colza ⁽²³⁾.

Nevin and Rajamohan 2004, 2009, administraron aceite copra, aceite virgen de coco, aceite de cacahuate y colesterol (8 % y 15 % de la dieta) a ratas Sprague-Dawley sanas y encontraron que en las ratas alimentadas con VCO bajaron sus niveles de

triacilglicéridos, fosfolípidos, colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y aumentó el colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) ⁽²⁰⁾ ⁽⁵⁾.

Kochikuzhyil 2010, en un modelo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina administró dietas enriquecidas con aceites: aceite de coco, aceite de palma y aceite de cacahuete. Encontrando que en el grupo de ratas alimentadas con aceite de coco, disminuyó el colesterol total, triglicéridos y glucosa en suero sanguíneo comparadas con los otros grupos alimentados con aceite de palma y cacahuete ⁽²⁴⁾.

Kamisah 2015, en un modelo de ratas hipertensas inducidas con aceite de palma recalentado, administró (1.42 mL/ Kg) VCO conjuntamente con el aceite de palma recalentado obtuvo que el grupo alimentado con VCO y aceite de palma recalentado no desarrolló hipertensión ⁽²⁵⁾.

Deol 2015, administró mezclas de aceite de soya y aceite de coco en la dieta a ratones machos sanos, encontrando que el grupo que consumía mayor cantidad de aceite de coco, disminuyó la obesidad y los niveles de glucosa e insulina en sangre. En este estudio también evaluaron la fructosa donde ellos encuentran que el aceite de soya es más obesogénico que la fructosa ⁽²⁶⁾.

1.6 Adipogénesis

La adipogénesis consiste en la generación de células comúnmente llamadas adipocitos que son las encargadas de acumular energía en forma de grasa dentro de ellas, estos forman tejido adiposo que puede ser blanco o marrón y varía por la función y el contenido de mitocondrias ⁽²⁷⁾.

En los animales el exceso de energía proveniente de la dieta se puede acumular en forma de triacilglicéridos; que en situaciones de ayuno prolongado o falta de carbohidratos se pueden procesar para obtener energía, calor y otros productos.

Para la lipogénesis o acumulación de grasa en forma de triacilglicéridos en adipocitos, y en la adipogénesis (diferenciación de preadipocitos) para convertirlos en

tejido adiposo blanco o marrón, intervienen muchos factores, algunos de estos son los factores de transcripción con una gran importancia biológica.

1.6.1 Factores de transcripción

Algunas proteínas que permiten la diferenciación de preadipocitos son regulados desde su expresión por factores de transcripción que actúan como reguladores de la expresión génica. Entre los factores de transcripción más importantes para el proceso de diferenciación destacan C/EBP α (proteína potenciadora de unión) y el receptor nuclear PPAR γ (Receptor activado por proliferadores peroxisomales). Otros factores de transcripción que destacan en la diferenciación adipocitaria son: C/EBP β , C/EBP δ , el factor de transcripción ADD1/SREBP1c (proteína de unión al elemento regulador del estero) y el receptor nuclear RXR (receptor de retinol X)⁽²⁷⁾.

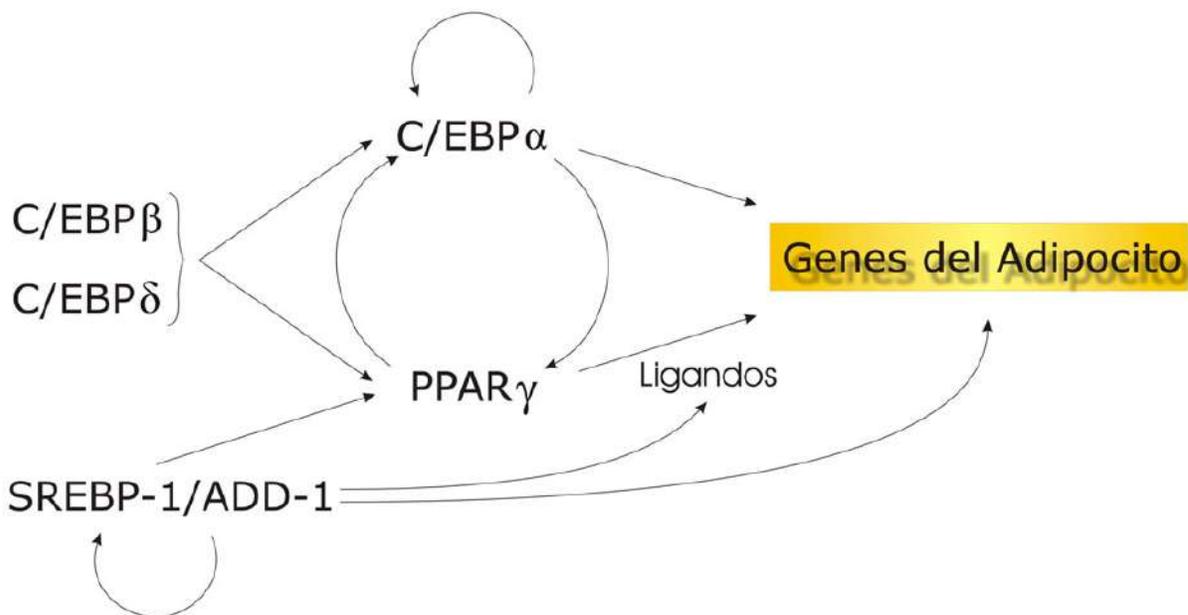


FIGURA 3. Factores de transcripción involucrados en la cascada adipogénica⁽²⁷⁾

Han en 2003, encontró que los ácidos grasos de cadena media inhiben eficientemente la expresión del factor de transcripción PPAR γ , reduciendo la síntesis de triacilglicéridos celulares. Por otra parte los ácidos grasos de cadena larga activan los factores transcripcionales PPAR γ ⁽²⁾.

En la figura 4 se puede apreciar el porqué de la teoría; que los ácidos grasos de cadena media inhiban a PPAR γ . En A) se puede observar una gráfica de la expresión de PPAR γ 2 en tejido adiposo proveniente de ratas alimentadas con MCT y LCT, donde se observa una menor expresión de PPAR γ 2 en el tejido adiposo de ratas alimentadas con MCT. En B) se observa como colocando células 3T3-L1 (línea celular preadipocitaria) en soluciones con diferente concentración de decanoato, la expresión de PPAR γ 2 va disminuyendo conforme aumenta la concentración. En C) se observa la síntesis de novo en adipocitos utilizando oleato y decanoato y se aprecia como el decanoato inhibe la acumulación de triglicéridos en adipocitos comparándola con el oleato. D) Esto no ocurre en células HepG2 que participan en la síntesis de triglicéridos pero que no expresan PPAR γ ⁽²⁾.

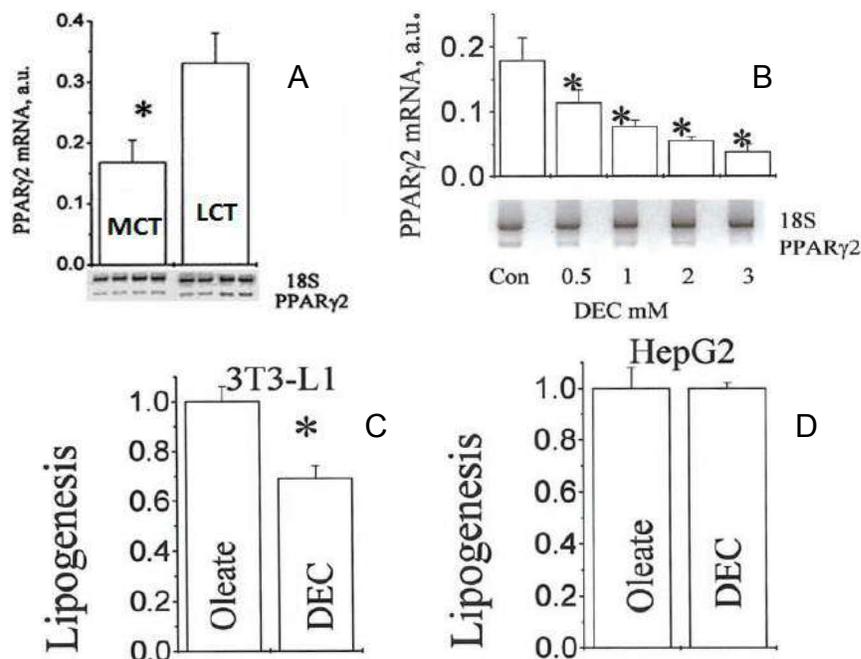


FIGURA 4. Inhibición de PPAR γ por MCT y la sal decanoato, en tejido adiposo blanco y preadipocitos⁽²⁾

Han, propone que los ácidos grasos de cadena media inhiben el factor de transcripción PPAR γ (figura 5) así como la lipoproteína lipasa (LPL) y acil-CoA sintasa 1 (ACS-1) en el tejido adiposo blanco y eleva la producción de calor y β -oxidación en el músculo y tejido adiposo marrón.

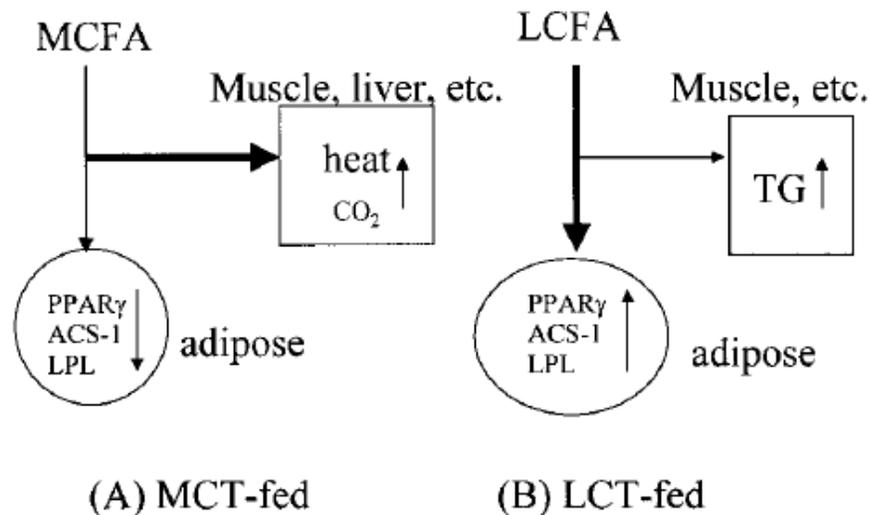


FIGURA 5. Mecanismo propuesto para la inhibición de lipogénesis en el adipocito ⁽²⁾

Por otra parte Greenberger en 1966 evaluó la absorción de los triacilglicéridos de cadena media y encuentra que al no necesitar de un transportador, los ácidos grasos de cadena media son más fácilmente absorbidos y al presentar este nivel de absorción las ratas consumen una menor cantidad de estos y presentan una menor liberación de ácidos grasos libres ^{(28) (29)}.

1.7 Regulación del apetito

El hambre, la saciedad y el balance energético, se regulan por un sistema neuroendocrino redundante, integrado a nivel del hipotálamo ⁽³⁰⁾.

El hipotálamo es la región donde se integra una compleja red de vías neuronales que regulan el hambre y la saciedad. Cuando se dañan experimentalmente los núcleos hipotalámicos ventromedial y paraventricular se originan hiperfagia y obesidad, en tanto que el daño del hipotálamo lateral produce anorexia severa y pérdida de peso corporal. El núcleo hipotalámico ventromedial es el centro de la saciedad, en tanto que el hipotálamo lateral es considerado el centro del hambre ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾.

NPY es una proteína del hipotálamo neuroendocrino que es miembro de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas. NPY se expresa a través del cerebro de los mamíferos con los mayores niveles de expresión encontrados en el núcleo arqueado del hipotálamo.

En la figura 6, se observa como la leptina e insulina inhiben la producción de neuropéptido Y en las neuronas orexigénicas del núcleo arqueado y activan la producción de melanocortina en las neuronas anorexigénicas. El neuropéptido Y, provoca la señal de hambre, mientras la melanocortina, provoca la señal de saciedad.

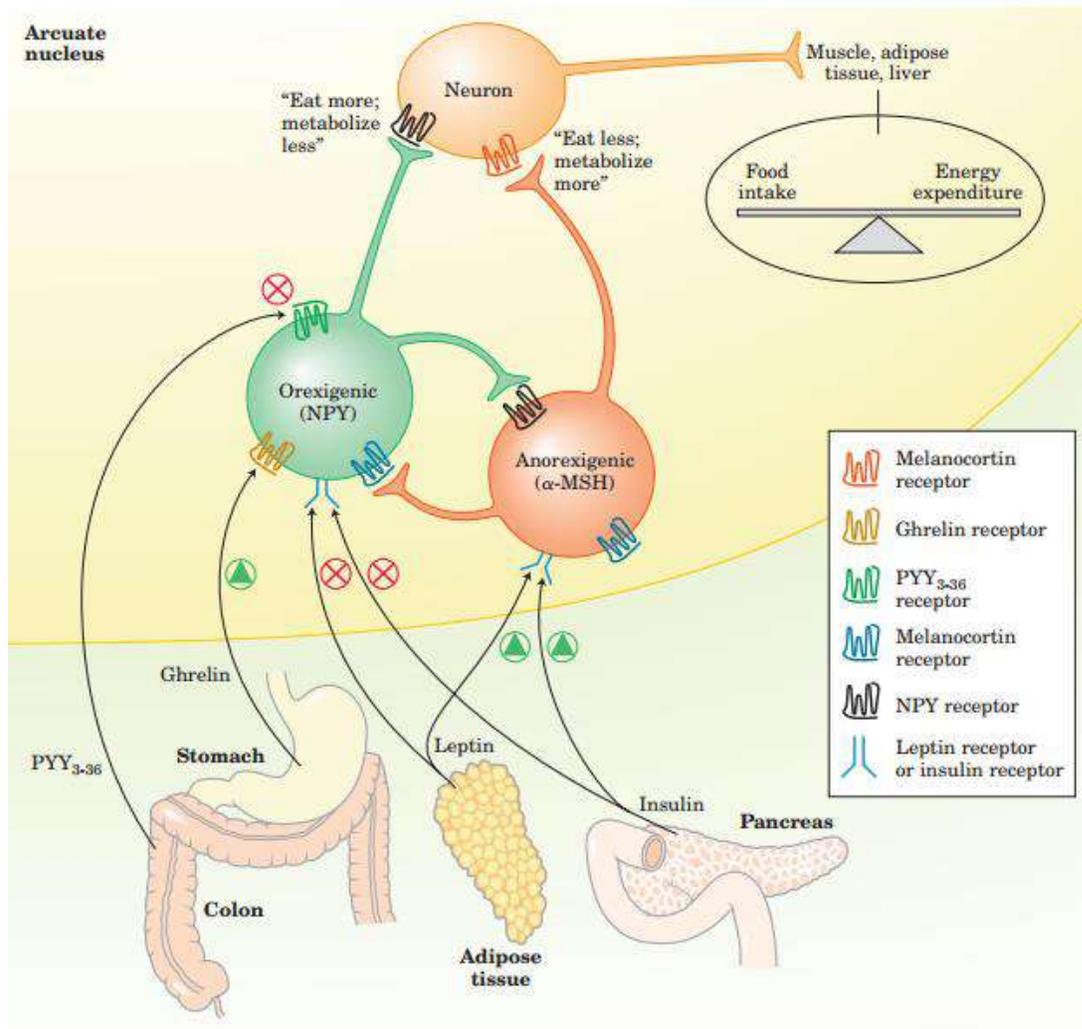


FIGURA 6. Regulación del apetito en el núcleo arqueado y papel del neuropéptido Y⁽¹⁰⁾

Dziedzic en el 2007 encontró que ratas alimentadas con dosis altas de grasas con ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados n-6, y ácidos grasos poliinsaturados n-3 disminuían la expresión de NPY y otros genes relacionados, mientras la expresión de melanocortina aumentaba. Esto se podía deber a que la insulina y leptina aumentan en estos animales. Por otra parte existe la teoría que el bloqueo crónico de receptores de melanocortina genera obesidad en ratas independientemente del NPY^{(32) (33)}.

Lee en el 2005 encontró que dos líneas celulares disminuían la expresión de la proteína r- agouti (AgRP) y de NPY con dosis altas de glucosa por intervención de la enzima, proteína quinasa activada por AMP (AMPK)⁽³⁴⁾.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Analizar el efecto de la ingesta de aceite de coco (virgen y refinado) sobre el síndrome metabólico en un modelo inducido por fructosa.

Objetivos específicos

- Inducir de síndrome metabólico con fructosa.
- Evaluar el efecto del aceite de coco (virgen y refinado) sobre los parámetros del síndrome metabólico.
- Evaluar la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y el apetito.
- Comparar los resultados con los obtenidos con SAA.

HIPÓTESIS

El consumo de aceite de coco (virgen y refinado) tendrá efectos benéficos sobre el síndrome metabólico, como resultado en parte de la modificación del apetito y factores de transcripción en *Rattus norvegicus*.

METODOLOGÍA

2.1 Diagrama general

Para el modelo experimental se utilizaron ratas Wistar macho recién destetadas, y para evitar contratiempos se mantuvieron por una semana con croqueta y agua *ad libitum*, seguido de la inducción de SMe por fructosa. Se continuó con la administración de sus respectivos aceites, una mezcla de 1 parte de aceite de maíz con 3 partes de aceite de canola (MC), aceite virgen de coco (VCO), aceite refinado de coco (RCO) y un suplemento alimentario enriquecido con aceite de algas con un alto contenido de ácido docosahexaenoico (SAA), durante la administración de aceite se realizaron las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Después de sacrificar a los animales se determinaron diversos parámetros de suero sanguíneo referentes al SMe, así como la determinación de la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y el apetito por RT-PCR.

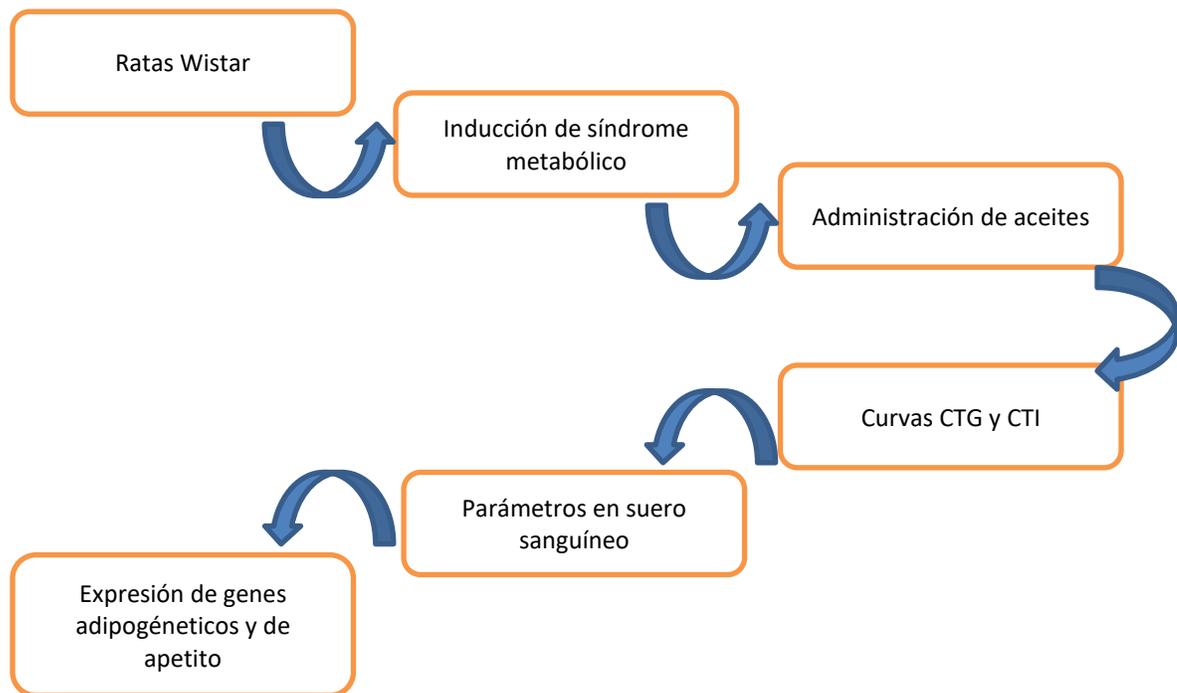


FIGURA 7. Diagrama general de metodología

2.2 Diseño experimental

En el diseño experimental (figura 8), los sujetos de estudio se dividieron en dos grupos, grupo testigo sano (TS) y el grupo que se le indujo SMe, al cual se le administró fructosa por 15 semanas y posteriormente su respectivo aceite o suplemento por 6 semanas antes del sacrificio. Los animales fueron colocados en jaulas individuales en un cuarto aislado a una temperatura $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un ciclo invertido de luz y oscuridad de 12 horas.

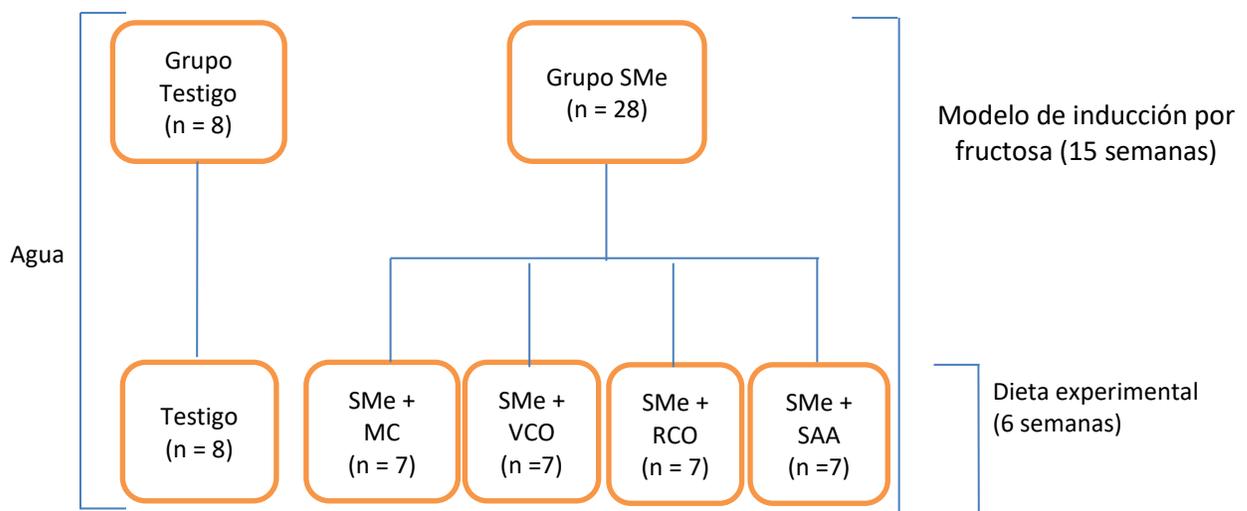


FIGURA 8. Diseño experimental para la evaluación de MC, VCO, RCO y SAA en un modelo de SMe

2.3 Dieta experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho y el alimento empleado fue Rodent laboratory 5001 *ad libitum*, se administró agua añadiendo el 30 % de fructosa p/v y se colocó *ad libitum* para la inducción de síndrome metabólico. Los aceites (MC, VCO, RCO) y el suplemento de aceite de alga (SAA) fueron administrados por vía intragástrica mediante una cánula y se le administró 1.5 mL de emulsión (anexos) que contenía 0.64 g de aceite o suplemento a cada rata por día, lo cual era equivalente al 8 % de consumo energético en promedio aproximadamente para los aceites y 5 % para el SAA.

2.4 Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos son los principales componentes de los triacilglicéridos. Son cadenas lipídicas hidrocarbonadas de diferente longitud o número de átomos de carbono con un grupo carboxilo en un extremo. Existen diferentes formas de clasificarlos y es primordial saber el contenido de ácidos grasos en los aceites y suplementos administrados a los animales experimentales.

Para determinar los ácidos grasos en los aceites (MC, VCO, RCO), previamente se metilaron para poderse analizar por cromatografía de gases. Debido a que el SAA no era un aceite puro se trató por el método de Folch⁽³⁵⁾.

2.4.1 Extracción de lípidos método de Folch

El método de Folch que se utilizó fue modificado y ajustado en el laboratorio de Postcosecha de la UNIDA. Dependiendo la cantidad de muestra era la proporción de los solventes y compuestos utilizados.

Para una muestra de 10 g se utilizó 200 mL de una mezcla de cloroformo- metanol (1:1), se pasó a un sonicador a 60 °C durante 10 minutos y se agitó ocasionalmente, después se agregaron 100 mL de cloroformo para alcanzar la relación (2:1), se agitó vigorosamente y se dejó reposar unos minutos, después se filtró con papel filtro y se pasó a un embudo de separación, se añadió 100 mL de KCl 1 molar y se agitó vigorosamente para dejar reposar toda la noche a 4 °C.

A la mañana siguiente se recuperó la fase inferior en un matraz de balón previamente llevado a un peso constante. Se rota-evaporó la muestra y se colocó nuevamente en el desecador para posteriormente pesar el matraz nuevamente para obtener el peso de la grasa extraída.

Se procedió a hacer lavados con 5 mL de una solución de hexano-isopropanol (3:2), y se pasó a tubos para almacenarlos hasta su posterior utilización.

2.4.2 Metilación de ácidos grasos

Se tomaron 100 mg de muestra en caso de los aceites (MC, VCO, RCO) y lo correspondiente a 100 mg del resultado de la extracción por el método de Folch, la muestra tratada por Folch se secó con nitrógeno y se corroboró el peso. Después a las muestras se les agregó 2 mL de hexano y se agitó, seguido de 200 μ L de KOH metanólico 2M y agitación con vortex por 30 segundos.

El siguiente paso fue la administración de 2 mL de NaCl saturado, que se suministró lentamente y pegado a la pared del tubo. Al final se recuperó la parte superior con extremo cuidado de no mezclar las fases.

2.4.3 Extracción de fitoesteroles

Los fitoesteroles son esteroides vegetales de origen vegetal y son similares al colesterol animal, están presentes en pequeñas cantidades en aceites vegetales y se está estudiando el efecto en la salud humana por el consumo de fitoesteroles.

Se pesaron 100 mg de aceite en tubos con rosca, en caso del SAA se tomó el volumen correspondiente a 100 mg, y se evaporó el solvente hasta llegar a peso constante.

A todas las muestras se les agregó 100 μ L de estándar interno dihidrocolesterol (1.28 mg/mL) y 3 mL de una solución de KOH metanólico 4N, se cubrió con abundante cinta teflón antes de colocar el tapón del tubo, se agitó con vortex y se dejó en agitación en un shaker por 18 horas.

Se procedió con dos lavados para eliminar las grasas saponificables agregando 2.5 mL de diclorometano y 5 mL de ácido cítrico 1 % en cada lavado, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm, se retiró la fase superior con ayuda de una pipeta Pasteur después de la centrifugación, al final se extrajo la fase superior completamente para evitar restos de agua. Las muestras se colocaron en tubos previamente pesados y se evaporaron, se agregó cloroformo o hexano para mantener la muestra o se resuspendió en 500 μ L de hexano-éter (8:2).

Se colocaron columnas en un recolector de vacío en fase sólida, se preparó la columna de sílice gel agregando un poco de sulfato de sodio y dejando pasar 3 mL de hexano para activar la columna. Se agregó la muestra y se dejó que empacara, y se añadieron 5 mL de hexano-éter (8-2), se dejó correr y se descartó el permeado. Se colocaron tubos cónicos previamente pesados y se añadió a la columna 4 mL de hexano-éter (1:1) y al final 3 mL de metanol. Una vez recogido el permeado se evaporó.

Para la silanización se añadió 2 mL de una mezcla de piridina, hexametildisilazano y clorotrimetilsilano se colocó en una parrilla de calentamiento a 40 °C por 15 minutos, se evaporó la mezcla silanizante y resuspendió en 1 mL de hexano, se agitó con vortex y se centrifugó; con cuidado se tomó la parte transparente y se colocó en un vial, se evaporó el solvente y añadieron 300 µL de hexano para proceder a inyectar en el cromatógrafo de gases.

2.4.4 Análisis de ésteres metílicos mediante GC-MS

Para el análisis se inyectó 2 µL de muestra en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 150 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 210 °C usando una rampa de calentamiento de 30 °C/min. De 210 °C pasó a 213 °C a una velocidad de 1 °C/min; finalmente, de esta temperatura pasó a 225 °C a una velocidad de 20 °C /min, durante 40 min haciendo un total de 50.6 min por corrida para cada muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 250 °C.

Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se

obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (FAME mix, C8:C22, No. de catálogo 18920-1AMP, Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones.

2.4.5 Método para cuantificar fitoesteroles en cromatógrafo

Para la determinación de fitoesteroles se inyectó 1 μ L de muestra en el cromatógrafo de gases 7820(G4350A), el programa del horno fue a las siguientes temperaturas: precalentado a 280 °C a un incremento de temperatura de 10 °C/min hasta llegar a 300 °C y se mantuvo esa temperatura por 53 min, seguido de 3 min a 280 °C, para hacer un tiempo total de corrida de 60 min.

Se utilizó la columna Agilent 19091J-413: 1637.67414 HP-5 5% phenyl methyl siloxan de 30 m x 320 μ m x 0.25 μ m con un flujo de N₂ de 1 mL/min. El detector FID fue calentado a 325 °C con un flujo de H₂ de 30 mL/min y un flujo de aire de 300 mL/min.

2.5 Curva de tolerancia a la glucosa e insulina

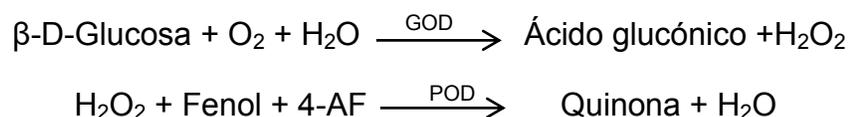
Las curvas de tolerancia a la glucosa (CTG), e insulina (CTI), que se llevaron a cabo en la quinta semana de administración de los aceites, para la CTG se inyectó por vía intraperitoneal glucosa (2 g/Kg) después de una noche de ayuno utilizando solución salina al 0.9 % como vehículo. Para la CTI se administró Insulina (0.75 u/Kg). Para las curvas se tomaron mediciones de glucosa antes de la inyección de la solución de glucosa o insulina y a los tiempos 15, 30, 60 y 120 min después de la inyección. Se midió la glucosa con ayuda del aparato FreeStyle Lite y sus tiras reactivas.⁽²⁶⁾

2.6 Parámetros séricos relativos al síndrome metabólico

Para la medición de los parámetros séricos se obtuvieron muestras de sangre de los animales tratados, se dejaron coagular, después se centrifugaron y se almacenaron a -70 °C.

2.6.1 Determinación de glucosa

La determinación de glucosa se lleva a cabo por la catálisis de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por la enzima glucosa oxidasa (GOD). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta indirectamente por fenol y un aceptor cromogénico de oxígeno, 4-aminofenazona (4-AF) catalizado por peroxidasa (POD):
(36) (37)



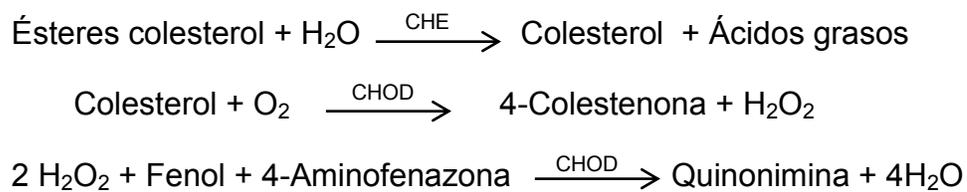
La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Para llevar a cabo las pruebas se descongelaron las muestras, se tomó 10 µL de suero o patrón y 1 mL de reactivo previamente atemperado a 25 °C, se incubaron a 25 °C por 20 min, la lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 505 nm. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la concentración: ⁽³⁷⁾

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.2 Determinación de colesterol

El principio de la prueba se basa en la reacción llevada a cabo por la enzima colesterol esterasa (CHE) con los ésteres de colesterol, liberando colesterol y ácidos grasos seguidos de la reacción de la enzima colesterol oxidasa (CHOD) con el colesterol; liberando 4-colestenona más H_2O_2 , el peróxido de hidrógeno reacciona con peroxidasa dando quinonimina un compuesto color rosado ⁽³⁸⁾.



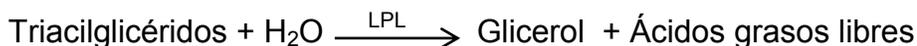
Las muestras de suero y reactivos fueron atemperados antes de su uso y se utilizaron colocando 10 μL de muestra o patrón con 1 mL de reactivo, se mezclaron e incubaron a 25 °C por 10 min y se leyeron en un espectrofotómetro a 505 nm. Se utilizó la siguiente fórmula: ⁽³⁹⁾

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.3 Determinación de triacilglicéridos

El principio químico del método consiste en la liberación del glicerol proveniente de los triacilglicéridos por la enzima lipoproteinlipasa (LPL), después el glicerol es fosforilado por glicerol quinasa (GK) y ATP, para producir glicerol-3-fosfato (G3P) más ADP. El G3P y O_2 es convertido a H_2O_2 mas dihidroxiacetona (DAP) por la glicerol fosfato deshidrogenasa (GOP). La última reacción se lleva a cabo entre H_2O_2 ,

4-aminofenazona y p-clorofenol catalizado por peroxidasa resultando en un compuesto color rosa (quinona) y agua^{(40) (41)}.

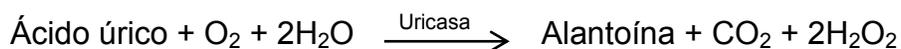


El procedimiento se realizó utilizando 10 μL de muestra o patrón y 1 mL de reactivo atemperado a 25 °C, se incubo durante 10 min a 25 °C y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro a 505 nm. Para determinar la concentración se utilizó la siguiente fórmula:⁽⁴²⁾

$$\frac{(\text{A})\text{Muestra} - (\text{A})\text{Blanco}}{(\text{A})\text{Patrón} - (\text{A})\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.4 Determinación de ácido úrico

El principio del método se basa en la oxidación del ácido úrico por la enzima uricasa a alantoína y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peróxido de hidrógeno se reduce en presencia de 4-aminofenazona (4-AF) y 2-4 diclorofenol sulfonato (DCPS) resultando en un compuesto rosáceo (quinonaimina)⁽⁴³⁾.



En primer lugar se descongelaron las muestras y se atemperaron junto con los reactivos los cuales se mezclaron en partes iguales para formar una nueva solución, se tomaron 25 μL de muestra o patrón y se colocaron en un tubo, después se agregó 1 mL de la solución antes preparada a cada tubo y se incubó por 10 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 520 nm y se determinó la concentración por la siguiente fórmula: ⁽⁴⁴⁾

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.5 Determinación de creatinina

La determinación de la creatinina se basa en el método de Jaffé descrito en el año 1886 donde la creatinina reacciona con ácido pícrico (picrato) en solución básica dando un compuesto de color rojizo. El método de Jaffé es un método colorimétrico que tiene algunos compuestos que interfieren en la reacción positiva o negativamente, sin embargo al medirlo en forma cinética se vuelve un método colorimétrico confiable ^{(45) (46)}.

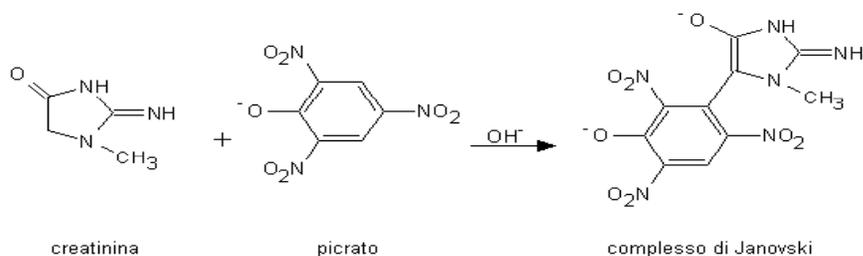


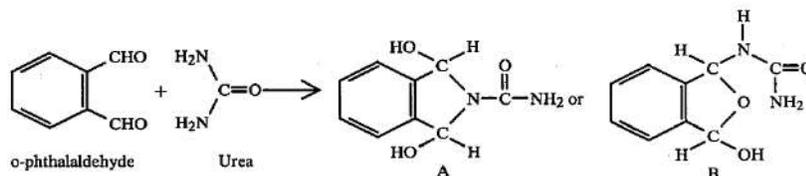
FIGURA 9. Reacción de Jaffé ⁽⁴⁷⁾

Para la realización de las pruebas se atemperaron muestras de suero y reactivos. Los reactivos de ácido pícrico (R1) e hidróxido sódico (R2) se mezclaron en volúmenes iguales. Se agregó 100 μL de muestra o patrón a una celda de plástico y 1 mL de la mezcla de reactivos, se midió la absorbancia a 492 nm en dos tiempos (30 seg y 120 seg) para realizar una cinética. La concentración se obtuvo por la siguiente fórmula: ⁽⁴⁸⁾

$$\frac{(\Delta A)\text{Muestra} - (\Delta A)\text{Blanco}}{(\Delta A)\text{Patrón} - (\Delta A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.6 Determinación de urea

La urea presente en la muestra reacciona con o-ftalaldehído en un medio ácido dando un compuesto coloreado ⁽⁴⁹⁾.

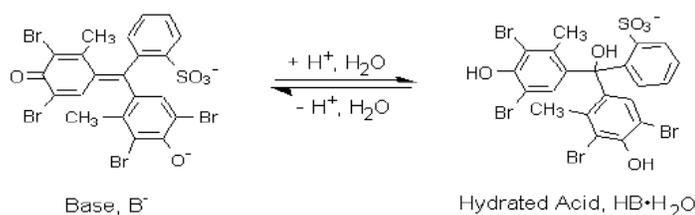


Se utilizó el método cinético para ayudar a disminuir las interferencias de otros compuestos que interfieran en la reacción. Los reactivos se colocaron en una incubadora a 37 °C y las muestras se dejaron atemperar en el laboratorio, se agregó 1 mL de R1 (o-ftalaldehído) a una celda y después 50 μL de muestra o patrón, se mezcló y se dejó incubar por 1 min, después del cual se añadió 1 mL de R2 (solución ácida), se mezcló y se midió absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm a los tiempos de 1 min y 2 min. Se utilizó la siguiente fórmula para realizar los cálculos: ⁽⁵⁰⁾

$$\frac{(\Delta A)\text{Muestra} - (\Delta A)\text{Blanco}}{(\Delta A)\text{Patrón} - (\Delta A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{mg/dL}$$

2.6.7 Determinación de albumina

El principio químico de esta prueba consiste en que la albumina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol, y al irse basicando el medio por la concentración de proteína, cambia de amarillo verdoso a verde azulado ⁽⁵¹⁾.



Para la realización de esta prueba se atemperaron reactivos y muestras, se añadieron 5 µL de muestra o patrón a un tubo y se agregó 1 mL de reactivo (verde bromocresol) se mezcló e incubo por 10 min a temperatura ambiente para después leer la absorbancia a 630 nm. Para realizar los cálculos se utilizó la siguiente fórmula: ⁽⁵²⁾

$$\frac{(A)\text{Muestra} - (A)\text{Blanco}}{(A)\text{Patrón} - (A)\text{Blanco}} * \text{Concentración de patrón} = \text{g/dL}$$

2.7 Expresión de genes por RT-PCR

La RT-PCR o PCR en tiempo real es un método que cuantifica la amplificación de genes utilizando fluoróforos. La detección de fluorescencia ocurre por ciclo de replicación y es detectada por el sistema óptico del equipo, el ROX es utilizado para

normalizar la señal de fluorescencia no relacionada con la PCR. Esta metodología se puede aplicar utilizando RNA o cDNA en cualquiera de los casos se requiere enzima retrotranscriptasa para convertir el RNA monocatenario en cDNA donde una de las cadenas es la complementaria del RNA con las bases correspondientes al DNA.⁽⁵³⁾
(54).

Los dos agentes reporteros más comunes son: SYBR Green que es un fluoróforo que se une a la doble cadena del DNA aumentando la fluorescencia conforme aumenta el número de amplicones. La otra forma común de producir la fluorescencia es mediante las sondas taqman que son oligonucleótidos con un fluoróforo y un interruptor. Conforme se libera un nuevo amplicon la sonda fluoresce, este sistema es muy específico y eficaz, sin embargo aumenta los costos de la reacción⁽⁵³⁾ (54).

En realidad la RT-PCR es una versión mejorada de una PCR donde se logra medir comparativamente la expresión de un gen con diversos métodos y tecnología añadida al equipo. Aunque existen diversos métodos de medir la expresión el más común y económico es por medio del método comparativo.

2.7.1 Método de Ct comparativo

Este método consiste en la comparación de los tratamientos a medir contra un calibrador, y se necesita medir un gen constitutivo de la misma muestra de cDNA o RNA. Este método está basado en la siguiente formula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dónde:

Ct = número de ciclos en el umbral

ΔCt = Ct gen - Ct gen endógeno

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt tratamiento - ΔCt calibrador

Para realizar este método se necesita hacer una validación de la eficiencia de amplificación de cada juego de primers. Para esto se realizan curvas estándar.

2.7.2 Curva estándar para eficiencia

Se realizan diluciones seriadas (1/10) de un calibrador a una concentración conocida utilizando los primers. Obteniendo una gráfica semi logarítmica donde la pendiente que indica una eficiencia del 100 % es -3.32. La ecuación de la regresión lineal es la siguiente:

$$Ct = m [\log(Qty)] + b$$

Dónde:

Ct = número de ciclos en el umbral

m = pendiente

Qty = cantidad inicial de DNA

b = punto de intercepción

La eficiencia se puede calcular con la pendiente de la recta en la siguiente formula:

$$E = (10^{-1/pendiente} - 1) * 100$$

Una manera fácil de entender porque -3.32 ciclos significa 100 % de eficiencia es basándose en el principio de PCR donde en un ciclo de replicación la polimerasa duplica el número de amplicones por lo tanto se necesitan 3.32 ciclos aproximadamente para subir un logaritmo decimal.

2.7.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con el método de trizol⁽⁵⁵⁾. Se tomó una parte de tejido y se molió en un mortero de acero inoxidable previamente esterilizado y enfriado con nitrógeno líquido, el tejido molido y congelado se colocó en tubos eppendorf, después se agregó trizol y se realizó el procedimiento como lo indica el fabricante. A excepción de las muestras referentes al tejido adiposo donde se agregó un paso extra después de que se agregó el trizol y se agitó vigorosamente se centrifugó y descartó la fase superior aceitosa, haciendo esto se continuó con el método del fabricante. A las extracciones se les midió la concentración de RNA con el Nanodrop 2000 UV-vis spectrophotometer y se comprobó la presencia de RNA corriendo geles de agarosa con bromuro de etidio (especificaciones en anexos).

2.7.4 Purificación y conversión de RNA a cDNA

Se tomó 1 µg de RNA por muestra y se purificó con DNase I del kit DNase Treatment and Removal Reagents⁽⁵⁶⁾, para después hacer la conversión a cDNA con RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit⁽⁵⁷⁾.

2.7.5 Expresión de NPY y PPAR γ

Para medir la expresión de los genes se utilizó con el equipo StepOne™ Real-Time PCR System, los genes a cuantificar fueron los genes de PPAR γ , NPY y como gen endógeno se utilizó β actina. Los tejidos utilizados fueron tejido adiposo blanco e hígado para PPAR γ e hipotálamo para NPY. Los reactivos necesarios para realizar las pruebas, como el SYBR Green, ROX, dNTPs, polimerasa... Fueron proporcionados por el KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit.

Los primers utilizados fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies y fueron resuspendidos en agua libre de nucleasas a 100 µM como solución de stock, con la

cual se preparó una solución a 10 μM de cada primer. Los primers utilizados en este trabajo fueron los siguientes: ⁽⁵⁸⁾ ⁽⁵⁹⁾

Gen	Primers
β actina	Forward: 5'-ACGAGGCCAGAGCAAGAG-3'
	Reverse: 5'-GGTGTGGTGCCAGATCTTCTC-3'
PPAR γ	Forward: 5'-ATTCTGGCCACCAACTTCGG-3'
	Reverse: 5'-TGGAAGCCTGATGCTTTATCCCA-3'
NPY	Forward: 5'-CACAGAAAATGCCCCAGAA-3'
	Reverse: 5'-GTCAGGAGAGCAAGTTTCATTCC-3'

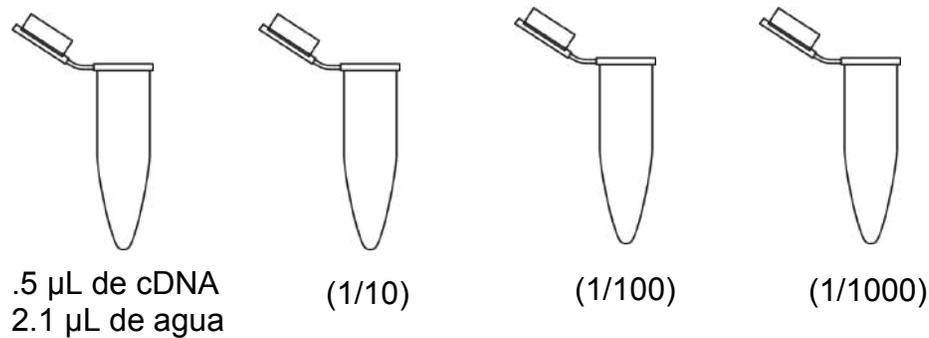
Para la expresión de genes, se realizaron experimentos previos para corroborar si los primers, condiciones de temperaturas y cDNA amplificaban en un termociclador para PCR. Los elementos de la PCR fueron los siguientes:

PCR						
Volumen total 10 μL	5 μL de Master mix	.25 μL de forward primer	.25 μL de reverse primer	.25 μL de cDNA	4.25 μL de H ₂ O	
Termociclador						
95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	35 ciclos	72 °C	12 °C
2 min	1 min	1 min	1 min		10 min	

Comprobado esto, se decidió pasar al equipo StepOne™ con la modificación de utilizar 61 °C en vez de 60 °C en el paso de alineamiento.

El primer paso realizado para obtener los niveles de expresión de los genes PPAR γ y NPY fue la realización de curvas estándar con los diferentes genes, para determinar la eficiencia de amplificación y obtener los umbrales de cada gen.

Para hacer las curvas de eficiencia se partió de una dilución (1/5.2) de cDNA y se hicieron diluciones seriadas decimales.



El volumen de reacción utilizado para RT PCR fue de 13 µL de los cuales estaban conformados de la siguiente manera:

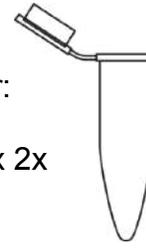
4.42 µL de Agua
6.5 µL de Master Mix 2x
200 nM de forward β -actina
200 nM de reverse β -actina
0.26 µL de ROX high 50x
1.3 µL de cDNA

Las curvas preliminares aportaron los datos de eficiencias, umbrales y la dilución a la cual medir la expresión de los genes. Se prepararon dos mezclas madres por vez, una para gen endógeno (β -actina) y otra para gen problema (PPAR γ o NPY).

Para 23 muestras añadir:
 101.66 µL de Agua
 149.5 µL de Master Mix 2x
 5.98 µL de forward β-actina
 5.98 µL de reverse β-actina
 5.98 µL de ROX high 50x



Para 23 muestras añadir:
 101.66 µL de Agua
 149.5 µL de Master Mix 2x
 5.98 µL de forward
 5.98 µL de reverse
 5.98 µL de ROX high 50x



Se tomó 11.7 µL de la mezcla madre y se cargó al pozo de la placa, se agregó el cDNA al final por duplicado. Se tapó la placa con una cubierta óptica y se centrifugó para romper las burbujas que se formaron.

El método utilizado en el equipo fue el siguiente:



Figura 10. Programa en el termociclador del equipo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo está enfocado en el efecto del aceite de coco sobre el síndrome metabólico. Sin embargo conjuntamente se evaluó el suplemento de aceite de alga con un alto contenido de DHA.

3.1 Análisis cromatografico de aceites

Para el perfil de ácidos grasos los aceites fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas después de realizar la metilación⁽⁶⁰⁾. En caso del SAA la metilación se realizó después de extraer la grasa por el método de Folch.⁽³⁵⁾ Como complemento se analizó el contenido de fitoesteroles en los aceites y el SAA.

3.1.1 Mezcla de aceite de Maíz y canola (MC)

La mezcla de los aceites de maíz y canola se realizó con el objetivo de obtener un aceite que no alterara los efectos provocados por la fructosa utilizando la relación de omegas 3 y 6⁽⁶¹⁾.

Este aceite es rico en ácido oleico y linoleico, los cuales se encuentran en una concentración considerable respecto a los otros ácidos grasos, si se comparan los resultados del ácido linoleico (omega 6) y el ácido linolénico (omega 3) tabla 4, se puede calcular una relación 15/1 aproximadamente.

TABLA 4. Perfil de ácidos grasos de aceite MC

Aceite MC (1 parte maíz: 3 partes canola)		
T.R. (min)	Ácido graso	Promedio (%)
17.039	Ácido palmitoleico (C16: 1)	0.03 ±0.02
17.147	Ácido palmítico (C16: 0)	5.97 ±0.205
18.172	Ácido linoleico (C18: 2)	31.49 ±2.235
18.246	Ácido oleico (C18:1)	58.59 ±2.395
18.263	Ácido linolénico (C18:3)	2.18 ±0.675
18.286	Ácido esteárico (C18:0)	1.66 ±0.25
19.345	Ácido eicosenoico (C20:1)	0.07 ±0.035
19.476	Ácido araquídico (C20:0)	0.02 ±0.005

Los fitoesteroles y fitoestanoles son esteroles de origen vegetal a los cuales se les atribuye efectos hipocolesterolémicos, que han demostrado beneficios contra enfermedades cardiovasculares ⁽⁶²⁾. Además se ha estudiado el efecto antioxidante de estos, abriendo la puerta para el uso de fitoesteroles como posibles gentes anticancerígenos ⁽⁶³⁾. Los fitoesteroles y fitoestanoles son compuestos no saponificables y la mezcla utilizada de aceite de maíz y aceite de canola, (tabla 5) demostró contener mayor cantidad de estos compuestos que los otros aceites.

TABLA 5. Contenido de fitoesteroles en aceite MC, extraídos de 100 mg de aceite

Aceite MC (1 parte maíz: 3 partes canola)		
T.R. (min)	Compuesto	ng/100mg
31.34	Campesterol	412 ±6.2
32.95	Estigmasterol	36 ±0.5
36.47	β sitosterol	801 ±24.8
37.48	Sitostanol	54 ±13.9
	Total	1303 ±44.4

3.1.2 Aceite de coco (VCO y RCO)

Se evaluaron dos diferentes aceites de coco, uno virgen y otro refinado que al ser evaluados por cromatografía de gases acoplado a masas. No se observó diferencia en el contenido de ácidos grasos entre estos aceites, tabla 6. Entre las muestras de VCO y RCO no existe una diferencia a simple vista. Sin embargo el aceite de virgen de coco también contiene antioxidantes y grasas insaponificables como fitoesteroles ⁽²¹⁾ ⁽²⁰⁾.

TABLA 6. Contenido de ácidos grasos en los dos aceites de coco (VCO y RCO)

Aceite de coco			
T.R. (min)	Ácido graso	VCO %	RCO %
12.175	Ácido caprílico (C8:0)	3.51±0.59	3.18±0.36
13.64	Ácido cáprico (C10:0)	3.04±0.32	3.14±0.11
14.904	Ácido láurico (C12: 0)	73.86±0.66	70.60±1.85
16.072	Ácido mirístico (14:0)	13.71±0.04	15.56±1.2
17.136	Ácido palmítico (C16: 0)	3.55±0.14	4.01±0.54
18.114	Ácido oleico (C18:1)	1.71±0.06	2.77±0.41
18.229	Ácido esteárico (C18:0)	0.64±0.025	0.74±0.18

Los fitoesteroles más comunes en los aceites de semillas y vegetales son el β -sitosterol y campesterol, el aceite de coco los contiene (tabla 7). Y aunque en la mezcla de aceite de maíz y canola existe un contenido mayor de fitoesteroles, el aceite de coco en especial el virgen de coco contiene tocoferol y compuestos fenolicos ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾, que también presentan efecto antioxidante y beneficios para la salud ⁽⁶⁴⁾.

TABLA 7. Fitoesteroles extraídos de la parte no saponificable de los aceites de coco

Aceite de Coco			
T.R. (min)	Compuesto	VCO	RCO
		ng/100mg	ng/100mg
31.34	Campesterol	23 ±1.5	25 ±1.0
32.95	Estigmasterol	22 ±0.5	18 ±0.7
36.47	β-sitosterol	71 ±0.3	65 ±2.2
37.48	Sitostanol	16 ±1.2	32 ±2.0
	Total	132 ±0.6	140 ±6.0

3.1.3 Suplemento de aceite de alga

El SAA, es un polvo blanco con una concentración aproximada de 30 % de aceite de alga, que en promedio contiene 44 % de ácido docosahexaenoico, y 12 % de ácido eicosapentaenoico, tabla 8. Este suplemento también contiene solidos de jarabe de glucosa, almidón de maíz entre otras cosas, (figura 63).

TABLA 8. Ácidos grasos del aceite de alga contenidos en SAA

Suplemento SAA		
T.R. (min)	Ácido graso	%
16.072	Ácido mirístico (C14:0)	5.06±0.115
17.136	Ácido palmítico (C16:0)	20.64±0.09
18.114	Ácido oleico (C18:1)	16.92±0.465
18.229	Ácido esteárico (C18:0)	1.11±0.19
20.53	Ácido eicosapentaenoico (C20:5)	12.18±0.575
20.64	Ácido docosahexaenoico (C22:6)	44.10±1.26

Recientemente a los ácidos grasos omega 3 se les ha descubierto variados beneficios en diversas enfermedades cardiovasculares, sistema nervioso central, cáncer, entre otras ⁽⁶⁵⁾ ⁽⁶⁶⁾ ⁽⁶⁷⁾. Los omegas 3 más estudiados son ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) la mayoría de las veces estudiados de manera conjunta. Pero algunos estudios están revelando efectos diferentes entre estos dos ácidos grasos ⁽⁶⁸⁾ ⁽⁶⁹⁾.

En la literatura el fitoesterol predominante en el aceite alga es el β -sitosterol ⁽⁷⁰⁾, sin embargo en la tabla 9 se observa que este suplemento presento un mayor contenido de estigmasterol. El cromatograma de la parte no saponificable del SAA (figura 43) mostró diversos compuestos que no fueron posibles de identificar.

TABLA 9. Principales fitoesteroles en 100 mg de aceite extraído del SAA

Suplemento SAA		
TR (min)	Compuesto	Promedio ng/100mg
31.34	Campesterol	-----
32.95	Estigmasterol	271 \pm 7.1
36.47	β -sitosterol	93 \pm 2.1
37.48	Sitostanol	-----
	Total	363 \pm 9.2

3.2 Análisis experimental

Durante el modelo experimental descrito anteriormente en la metodología se fue midiendo semanalmente los siguientes parámetros: Consumo de alimento, solución de fructosa al 30 %, peso y talla de cada animal experimental. La medición de estos parámetros arrojó los siguientes resultados.

En la figura 11 se observa el consumo de croqueta por parte de los animales, donde se destaca el mayor consumo de croqueta por parte del grupo TS. También se observa que los animales de los grupos SMe conforme pasaba el tiempo consumían menores cantidades de alimento.

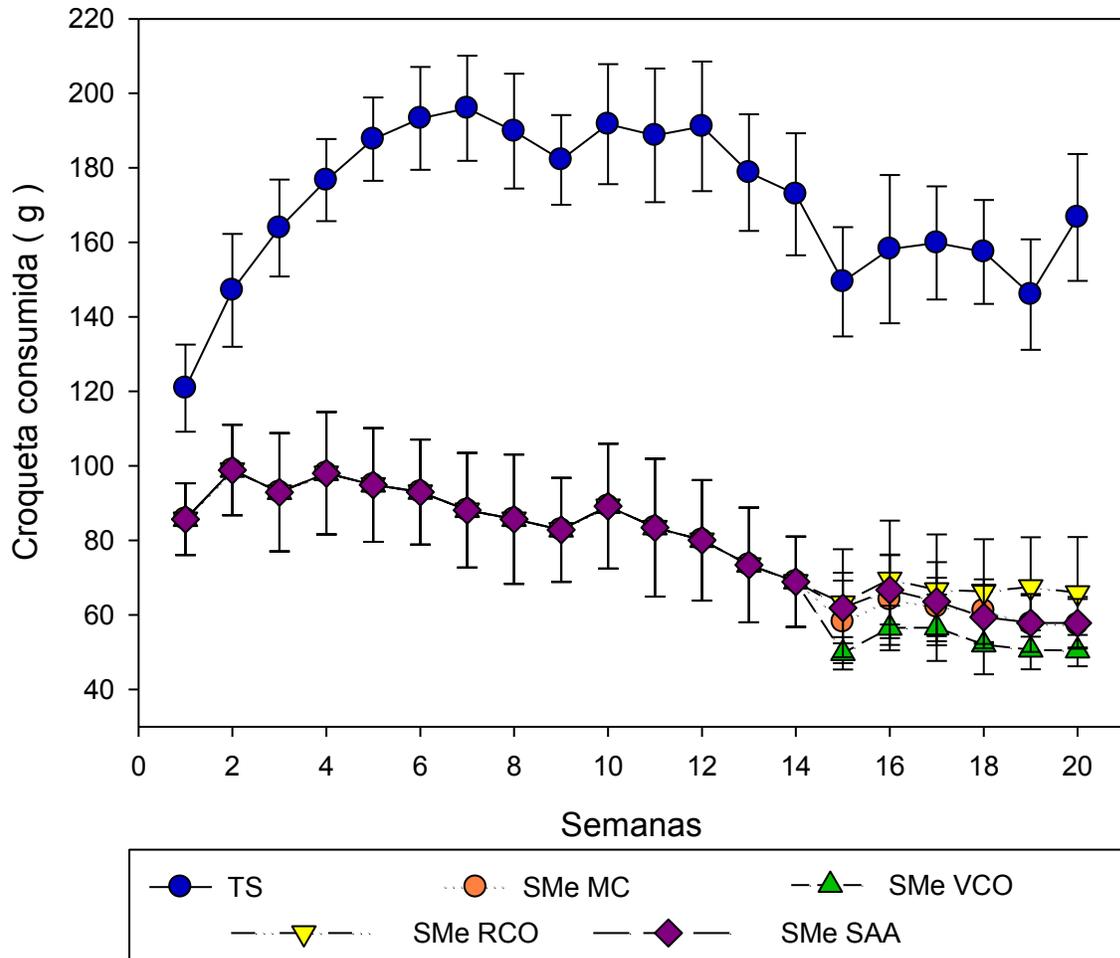


FIGURA 11. Alimento consumido en promedio por cada animal del grupo en una semana.

En la figura 12 se observa el consumo energético de los animales en Kcal y se aprecia como el grupo TS al cual no se le administró fructosa al 30 %, tuvo un menor consumo calórico mientras el resto de los grupos experimentales obtuvieron un

aporte calórico extra proporcionado por la fructosa. En la semana 15 se empezó a administrar su respectivo aceite y los animales con SMe comenzaron a tener un repunte en la energía consumida.

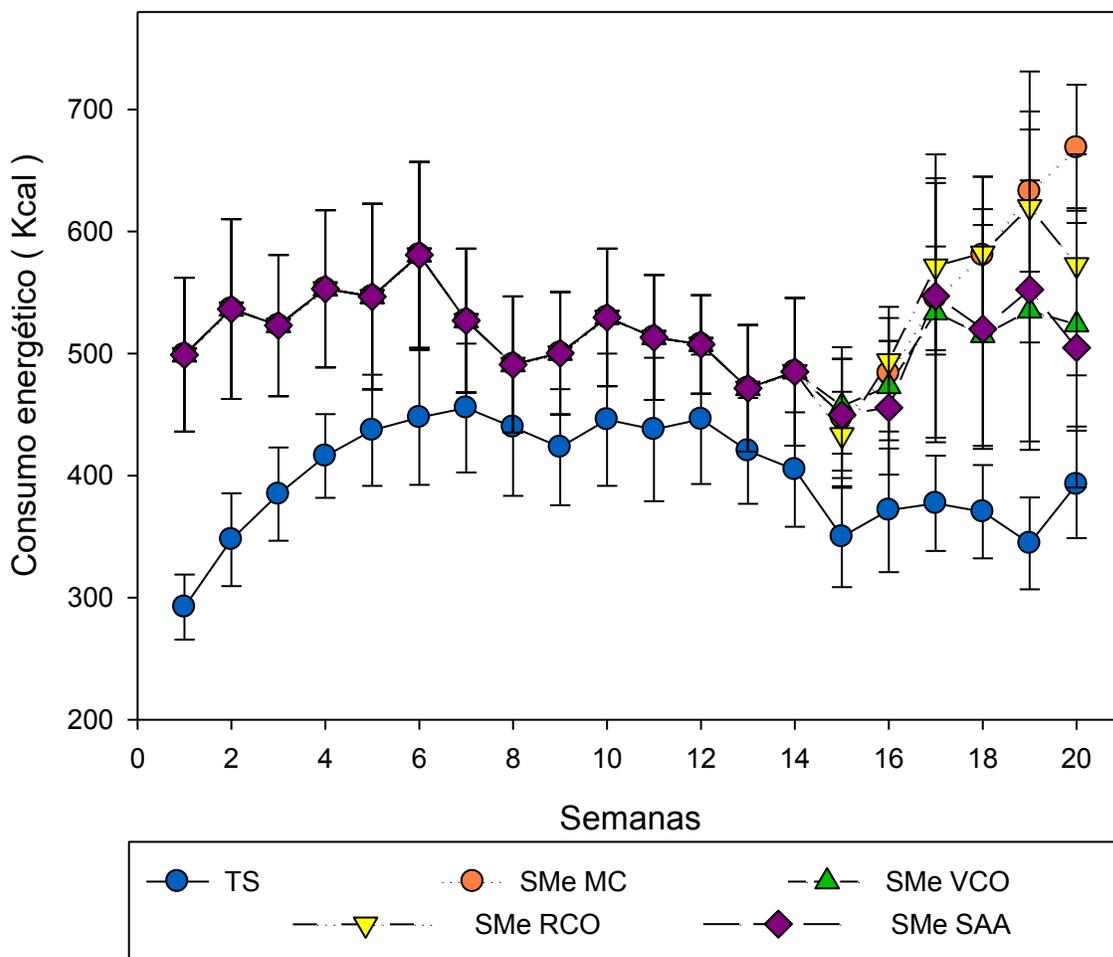


FIGURA 12. Consumo en Kcal aportadas por croqueta, fructosa y aceite o suplemento

Los animales en los grupos con SMe tuvieron una mayor ganancia de peso, comparados con el grupo sano. Sin embargo esta tendencia no fue estadísticamente significativa (figura 13).

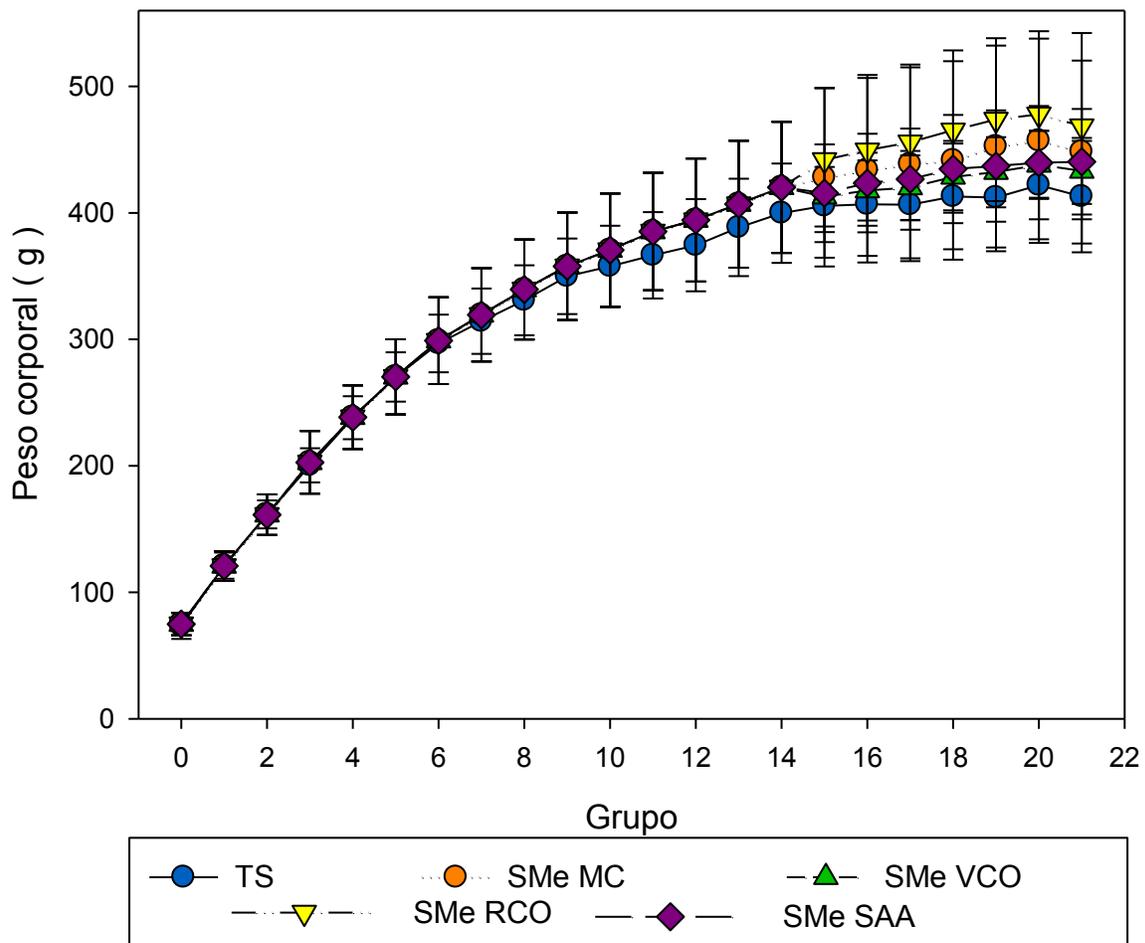


FIGURA 13. Promedio del peso del grupo semana a semana

3.3 Análisis de inducción de síndrome metabólico 14 semanas

A las 14 semanas se midieron los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos para confirmar un cambio del grupo SMe respecto al grupo TS. En la figura 14 se observa una elevación de la glucosa por parte del grupo SMe pudiéndolo asociar con la presencia de síndrome metabólico.

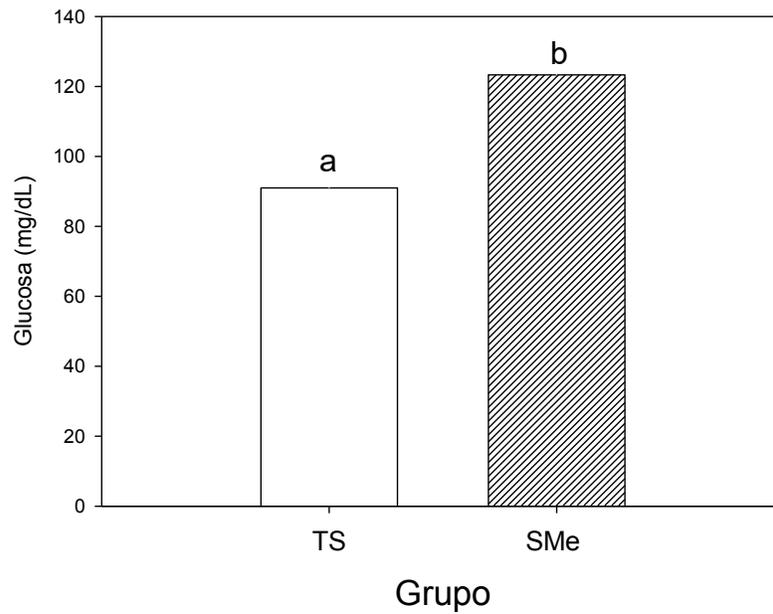


FIGURA 14. Glucosa a 14 semanas de experimento

En la figura 15 se observan las mediciones de colesterol a las 14 semanas y se aprecia una diferencia estadística entre los niveles de colesterol del grupo TS y el grupo al que se le administró fructosa al 30 %.

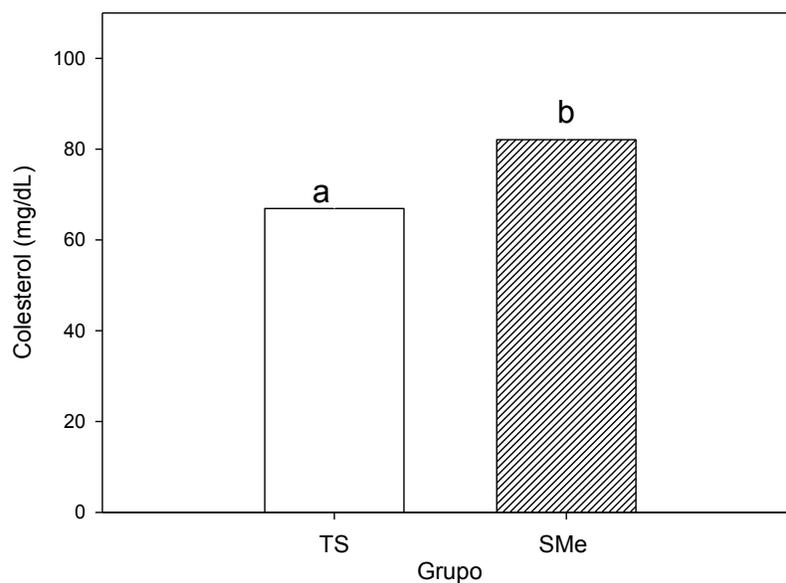


FIGURA 15. Colesterol a 14 semanas de experimento

La primera fuente de energía para el organismo proviene de los carbohidratos ingeridos, el organismo puede almacenar unos cientos de gramos en forma de glucógeno lo suficiente para unas 12 horas de energía, el resto se convierte en triacilglicéridos ⁽¹⁸⁾. Al suministrar fructosa al 30 % es lógico que aumentara el nivel de triacilglicéridos en la sangre para los animales del grupo SMe, figura 16.

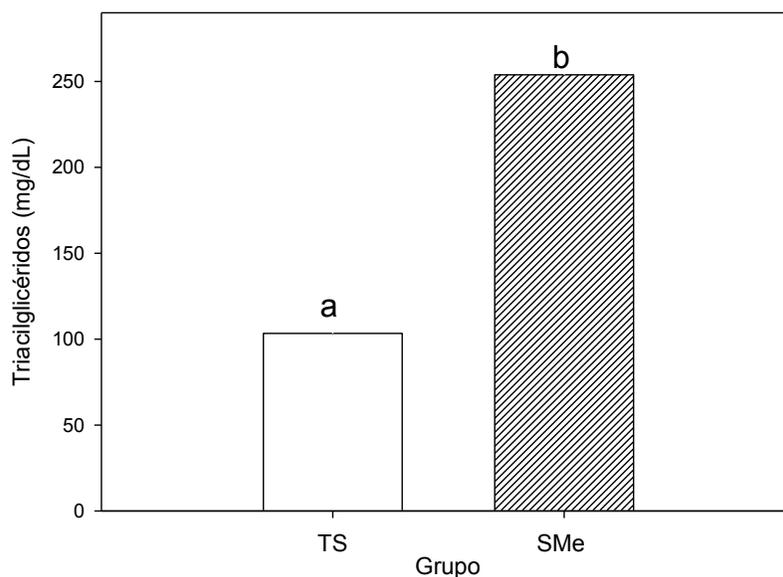


FIGURA 16. Triacilglicéridos a 14 semanas de experimento

3.4 Recolección de muestras y tejidos

El sacrificio de los animales experimentales se realizó cumpliendo 21 semanas del comienzo del experimento, las ratas fueron puestas en ayuno durante toda la noche, después se recolectaron muestras de sangre y se diseccionaron, retirando diferentes órganos: hígado, tejido adiposo epididimal, tejido adiposo intercostal, grasa pericárdica y visceral.

Al extraer y pesar el hígado de los animales se encontró que las ratas de los grupos SMe VCO y SMe SAA presentaban un menor porcentaje de peso menor que los grupos SMe MC y SMe RCO figura 17. Una porción del hígado se utilizó para la extracción de RNA por estar involucrado en el metabolismo lipídico para medir la expresión de PPAR γ . El incremento en la entrada de ácidos grasos libres al combinarse con alteraciones potenciales en el metabolismo hepático puede resultar en esteatosis hepática ⁽⁷¹⁾, el aceite de coco aunque no activa a PPAR γ como lo hacen los omegas 3 ⁽⁷²⁾, mejora el metabolismo lipídico por su contenido de ácidos grasos de cadena media y compuestos de la parte no saponificable ⁽²⁰⁾.

El porcentaje de peso del tejido adiposo epididimal figura 18, indica un mayor peso y por consiguiente indica una mayor acumulación de grasa por parte del grupo SMe MC. El tejido adiposo epididimal fue escogido para extraer el RNA para las pruebas de expresión de PPAR γ .

En el peso del tejido adiposo intercostal, no hubo diferencia entre ninguno de los grupos que consumió fructosa, figura 19. Esta grasa está unida a los riñones y las glándulas suprarrenales, la parte más cercana al riñón se considera tejido adiposo marrón y difiere en las cualidades de almacenamiento, por lo cual se decidió no utilizar este tejido para los análisis de expresión.

En el porcentaje de peso del tejido adiposo visceral figura 20, no se halló diferencia entre ningún grupo, en la extracción de este tipo de tejido es complicada y debido a esto es fácil cometer errores, este es uno de los factores que impidió realizar un buen análisis estadístico del peso del tejido. Un aumento en el tejido adiposo visceral predispone a enfermedades del hígado e hiperinsulinemia⁽⁷¹⁾.

El peso del tejido adiposo epicárdico o grasa pericárdica pudo ser influenciado a la hora de la extracción, y por consecuencia en la figura 21, solo encontramos la diferencia entre el grupo TS y el grupo SMe SAA. Aunque no existe diferencia significativa entre los grupos alimentados con fructosa, al VCO se le atribuyen efectos; vasodilatadores, cardioprotectores, antilipémicos y antiaterogénicos^{(25) (20) (73)}.

Al juntar el total de tejidos adiposos extraídos se observa (figura 22) que no existe una diferencia significativa entre los grupos suplementados con fructosa al 30 %, esto puede ser por la fisiología y metabolismo de las ratas. Al estar consumiendo fructosa durante todo el experimento los animales convertían la fructosa en grasa, y aunque la obesidad es uno de los factores de riesgo para presentar síndrome metabólico y diabetes mellitus tanto una persona delgada como una obesa pueden desarrollar resistencia a la insulina y síndrome metabólico⁽¹⁷⁾.

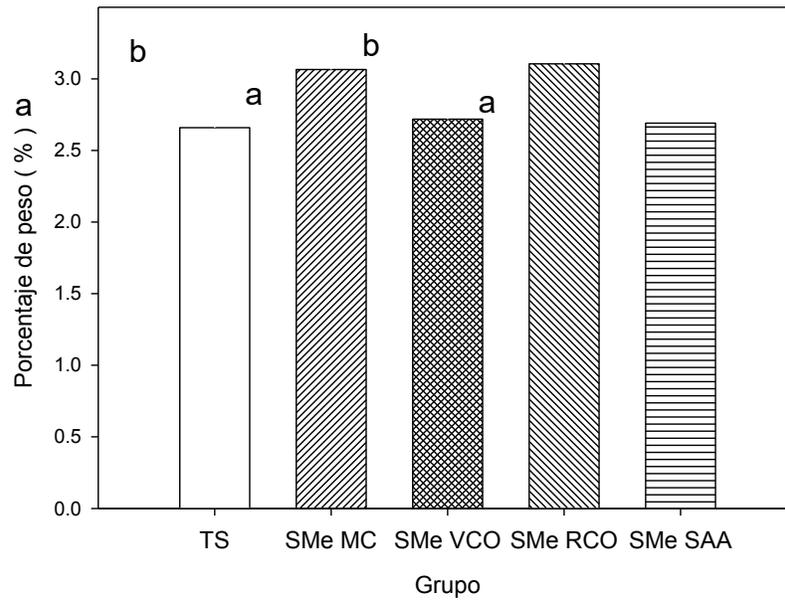


FIGURA 17. Porcentaje de peso del hígado respecto al peso del animal experimental

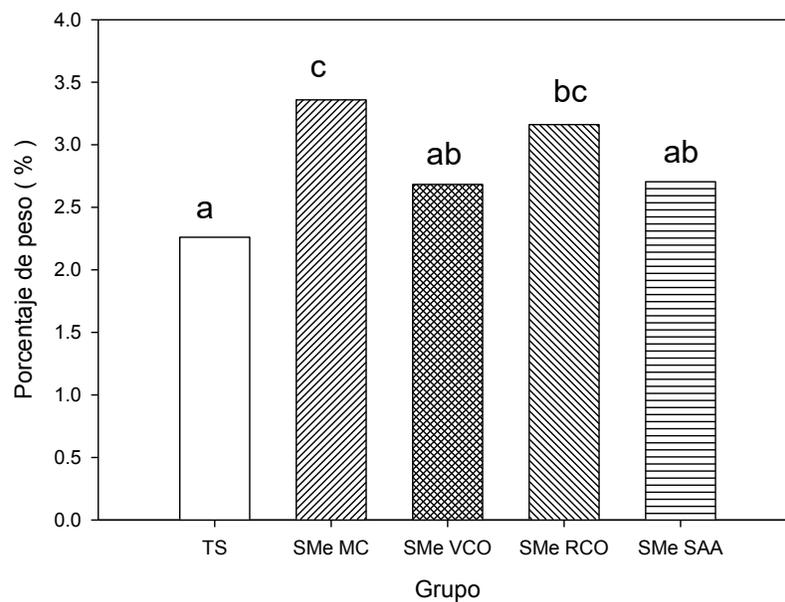


FIGURA 18. Porcentaje de peso del tejido adiposo epididimal respecto al peso del animal experimental

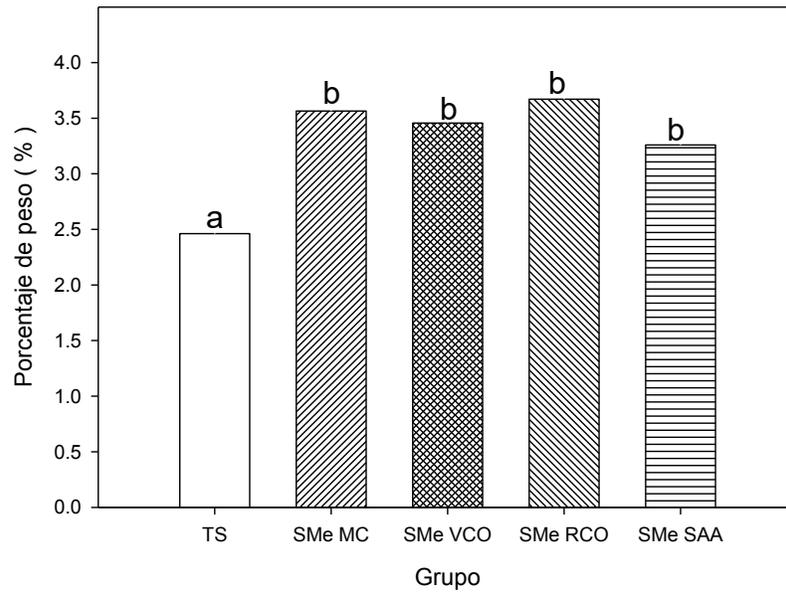


FIGURA 19. Porcentaje de peso del tejido adiposo intercostal respecto al peso del animal experimental

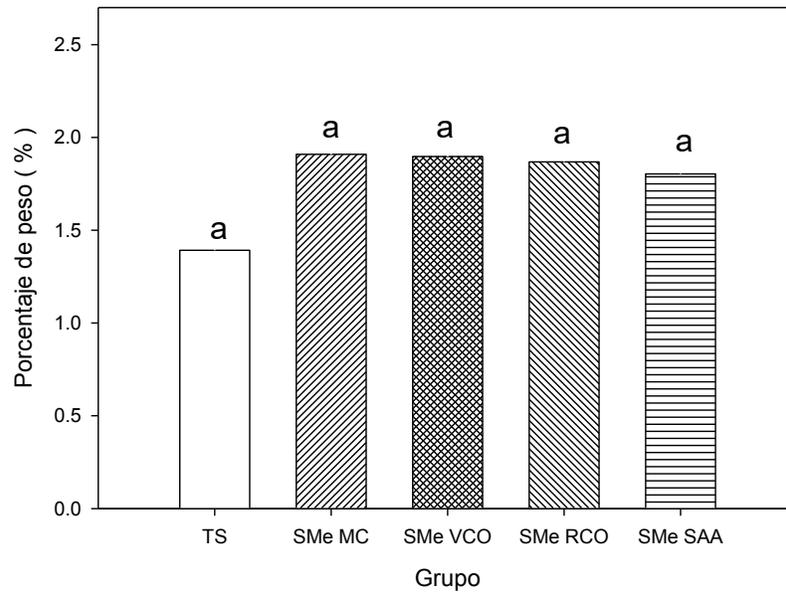


FIGURA 20. Porcentaje de peso del tejido adiposo visceral respecto al peso del animal experimental

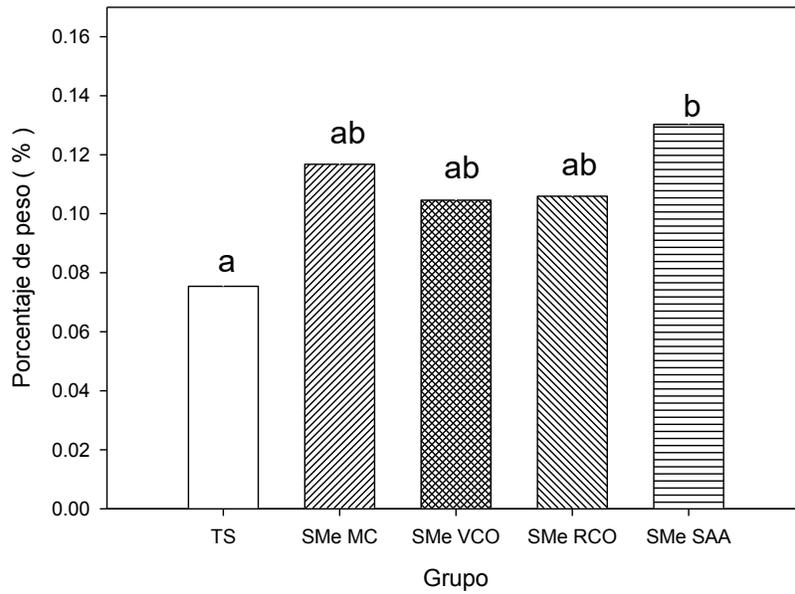


FIGURA 21. Porcentaje de peso del tejido adiposo epicárdico respecto al peso del animal experimental

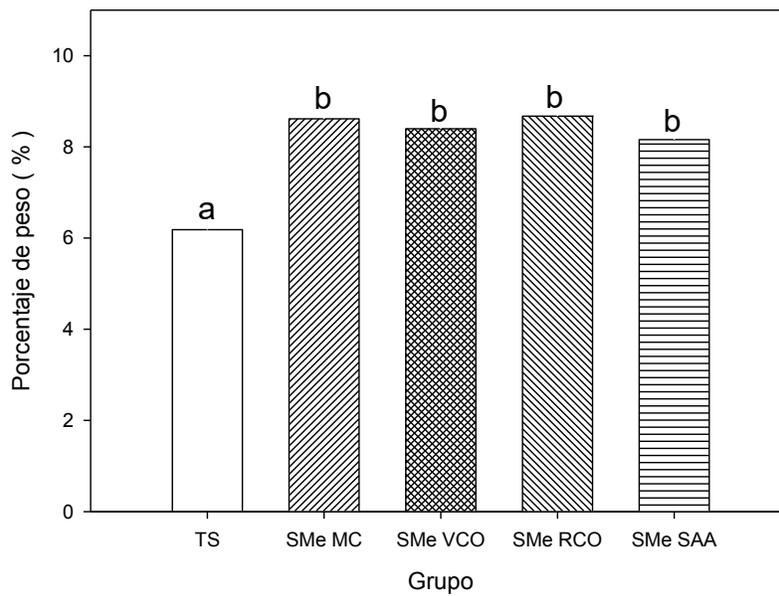


FIGURA 22. Porcentaje de la suma de los tejidos adiposos recolectados con respecto al animal experimental

3.5 Resultados de análisis séricos al final del experimento

Los resultados de glucosa al final del experimento (figura 23) indican que los animales suministrados con VCO, SAA bajaron la glucosa 28 % y 23 % respectivamente comparándolos con el grupo SMe MC, el aceite RCO no presento un efecto sobre los niveles de glucosa. La mayoría de los efectos benéficos del aceite de coco se considera que son debido al contenido de compuestos no saponificables, como fenoles, fitoesteroles, tocoferol ^{(25) (20) (5) (21)}, sin embargo se les considera que los ácidos grasos de cadena media juegan un papel importante al bajar los niveles de glucosa e insulina ⁽²⁴⁾. En especial el ácido cáprico y ácido láurico que promueven la secreción de insulina ⁽⁷⁴⁾.

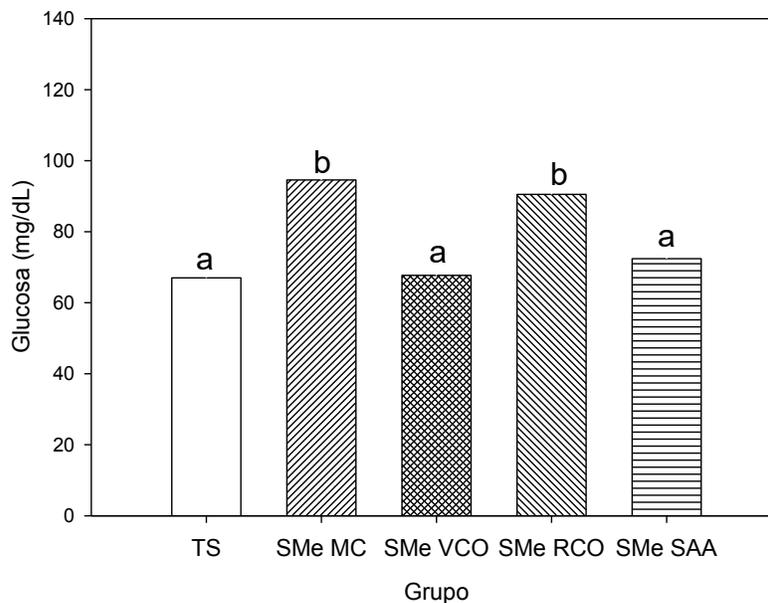


FIGURA 23. Resultados glucosa al final del experimento

Los niveles de colesterol (figura 24) de los animales al final del experimento no presentaron una diferencia significativa entre el grupo TS, SMe MC y SMe VCO, solamente un aumento del 17 % por el grupo SMe RCO comparándolo con el grupo SMe MC y una reducción del 19 % por parte del grupo SMe SAA. Indicando una

reducción del colesterol por parte del VCO y el SAA. La diferencia entre el grupo SMe VCO y SMe RCO se puede deber al mayor contenido de compuestos fenólicos del VCO y a una sinergia de estos con el tocoferol y fitoesteros, el RCO pierde compuestos fenólicos y tocoferol por calor a la hora de extraer el aceite y la refinación ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾. También se encuentra un efecto antitrombótico por parte del VCO ⁽⁷⁵⁾. Aunque existen artículos que indican que el aceite de coco eleva los niveles de colesterol, estos han utilizado aceite de coco hidrogenado, que contiene un menor número de compuestos no saponificables con actividad biológica ⁽⁷⁶⁾ ⁽⁵⁾.

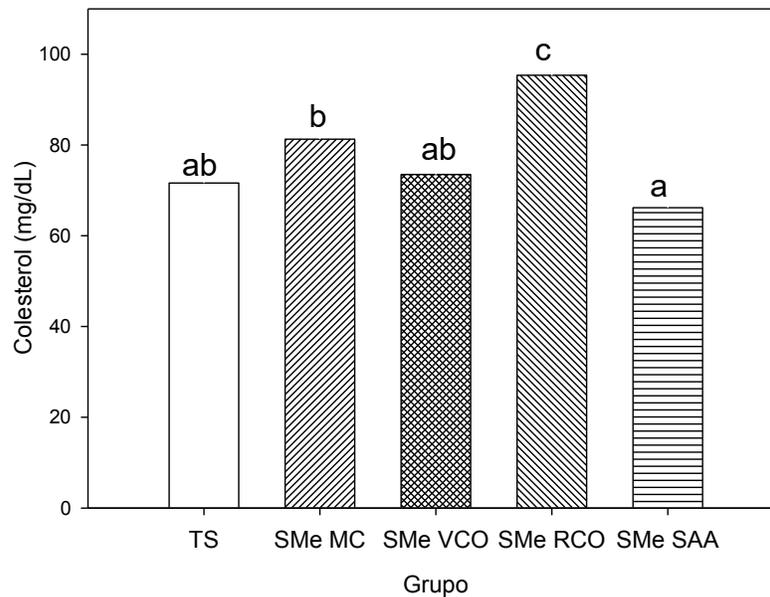


FIGURA 24. Resultados de colesterol al final del experimento

Al medir los niveles de triacilglicéridos al final del experimento (figura 25) se observó como el grupo SMe MC mantuvo el nivel de triacilglicéridos igual al de las 14 semanas (figura 16), y solo el grupo SMe VCO presento una diferencia en la disminución de triacilglicéridos 34 %. Existen diversos estudios donde se presenta disminución de triacilglicéridos en la sangre por el consumo de ácidos grasos de cadena media y aceite virgen de coco, los cuales encuentran que estos efectos se

deben a la diferencias de absorción entre los ácidos grasos de cadena media, que son más fácilmente hidrolizados en el intestino ⁽²⁸⁾, y al ser más digeribles que los ácidos grasos de cadena larga los animales que consumen LCT, lo compensan consumiendo mayor cantidad ⁽²⁹⁾. Los ácidos grasos de cadena media al ser más fácilmente absorbidos se producen una menor cantidad de ácidos grasos libres provocando una menor resistencia a la insulina ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁷⁾.

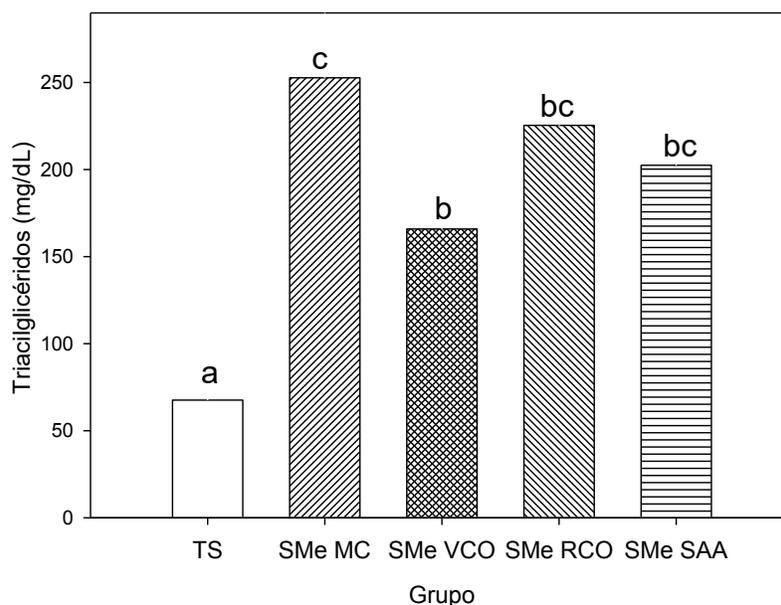


FIGURA 25. Resultados de triacilglicéridos al final del experimento

El ácido úrico se deriva de la degradación de purinas y niveles altos de ácido úrico en la sangre, son indicativos de un funcionamiento anormal de los riñones al purificar. El grupo SMe RCO presento un mayor nivel de ácido úrico 53 % (figura 26), en el resto de los grupos no hubo diferencia significativa. Aunque el ácido úrico no se toma en cuenta a la hora de diagnosticar SMe, existen estudios que encuentran una asociación entre el ácido úrico y la hipertensión y disfunción cardiaca ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾, el efecto perjudicial del ácido úrico en el riñón involucra daño endotelial y el incremento en la presión hidrostática, además niveles altos de ácido úrico elevan el sistema renina-

angiotensina aldosterona que alteran el equilibrio de electrolitos del agua repercutiendo en la aparición de hipertensión ⁽⁷⁹⁾.

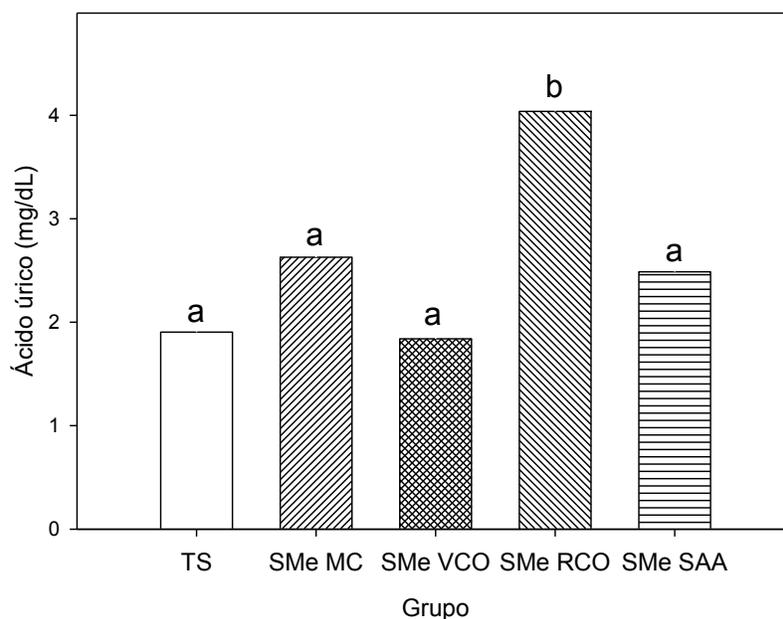


FIGURA 26. Resultados de ácido úrico al final del experimento

Aunque existen diferencias entre las mediciones de albumina en suero (figura 27), por parte de los grupos SMe MC y SMe RCO que presentan una mayor concentración de albumina en suero, y aunque niveles altos de albumina en la sangre estén asociados al síndrome metabólico, esto puede ser un factor de protección contra el riesgo de SMe ⁽⁸⁰⁾.

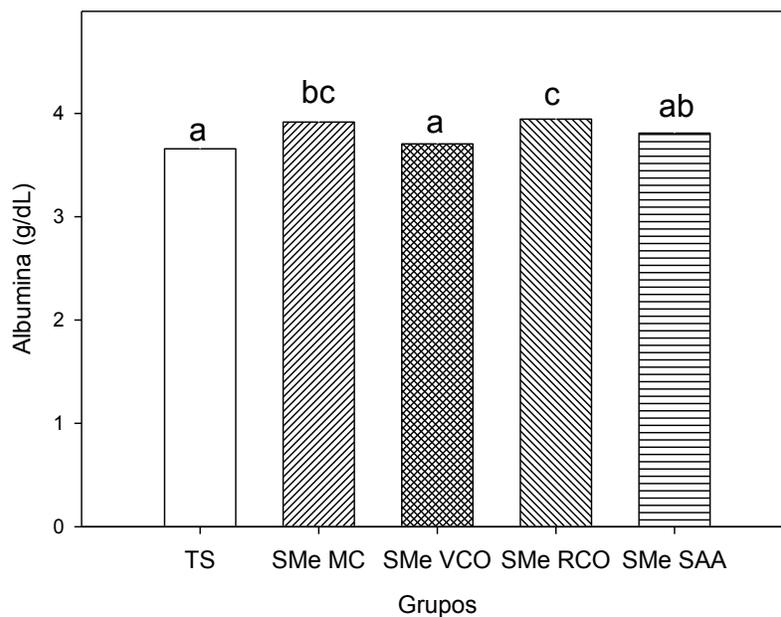


FIGURA 27. Resultados de albumina al final del experimento

La creatinina es un producto de desecho generado por la degradación de creatina en los músculos y que los riñones filtran para excretar en la orina, niveles altos de esta en la sangre se asocia con un malfuncionamiento de los riñones. Los niveles de creatinina (figura 28), revelan que no existe diferencia entre los grupos.

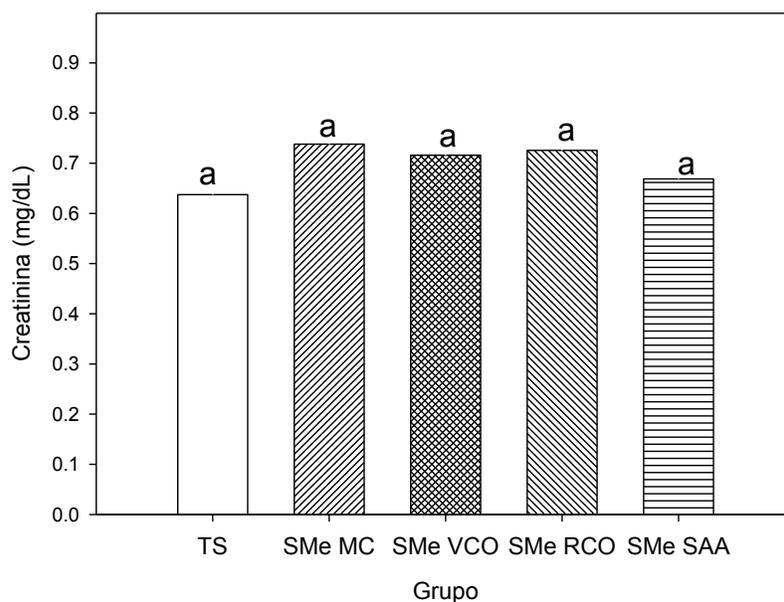


FIGURA 28. Resultados de creatinina al final del experimento

En la figura 29 se observa que el grupo TS presento el mayor nivel de urea en la sangre y aunque niveles altos indiquen un posible malfuncionamiento renal, este grupo consumió una mayor cantidad de proteína proporcionada por la croqueta, y como la urea es el producto resultante de la degradación de las proteínas, es posible que la mayor concentración de urea del grupo TS, se deba a eso. Sin embargo el grupo SMe RCO presento un mayor contenido de urea entre los grupos SMe y en concordancia con los resultados de ácido úrico (figura 26) es indicativo de un posible daño renal.

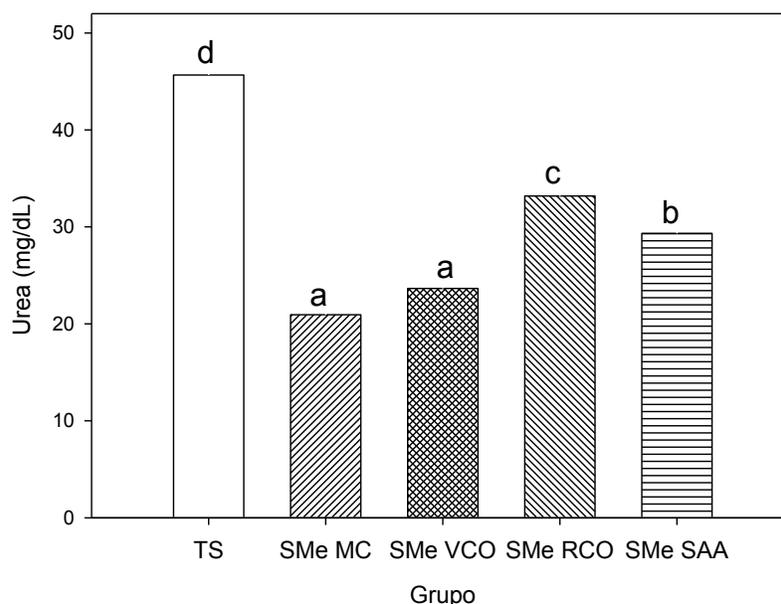


FIGURA 29. Resultados de urea al final del experimento

3.6 Curvas de tolerancia a la glucosa e insulina

Las curvas de tolerancia a la glucosa son una de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, y la curva de tolerancia a la insulina se utiliza para observar si existe resistencia a la insulina.

En la figura 30, se aprecia un promedio grupal de las curvas de tolerancia a la insulina graficadas con su desviación estándar, y se observa como el grupo SMe MC tiene una tendencia a una mayor área, que se ve reflejada en la gráfica del área bajo la curva (figura 31) donde se observa una mayor área por parte del grupo SMe MC donde existe una diferencia entre este grupo y el resto, indicando que el resto de los grupos no presenta una resistencia a la insulina y en todo caso el grupo SMe MC presenta resistencia a la insulina. Se ha encontrado que los triacilglicéridos de cadena media son mejor absorbidos provocando una menor cantidad de ácidos grasos libres y por consiguiente una menor resistencia a la insulina ⁽²⁸⁾ ⁽²⁹⁾, en el caso del grupo SMe SAA la mayor sensibilidad a la insulina puede provenir por la

expresión y activación de PPAR γ y genes a los que este factor de transcripción induce ⁽⁷²⁾.

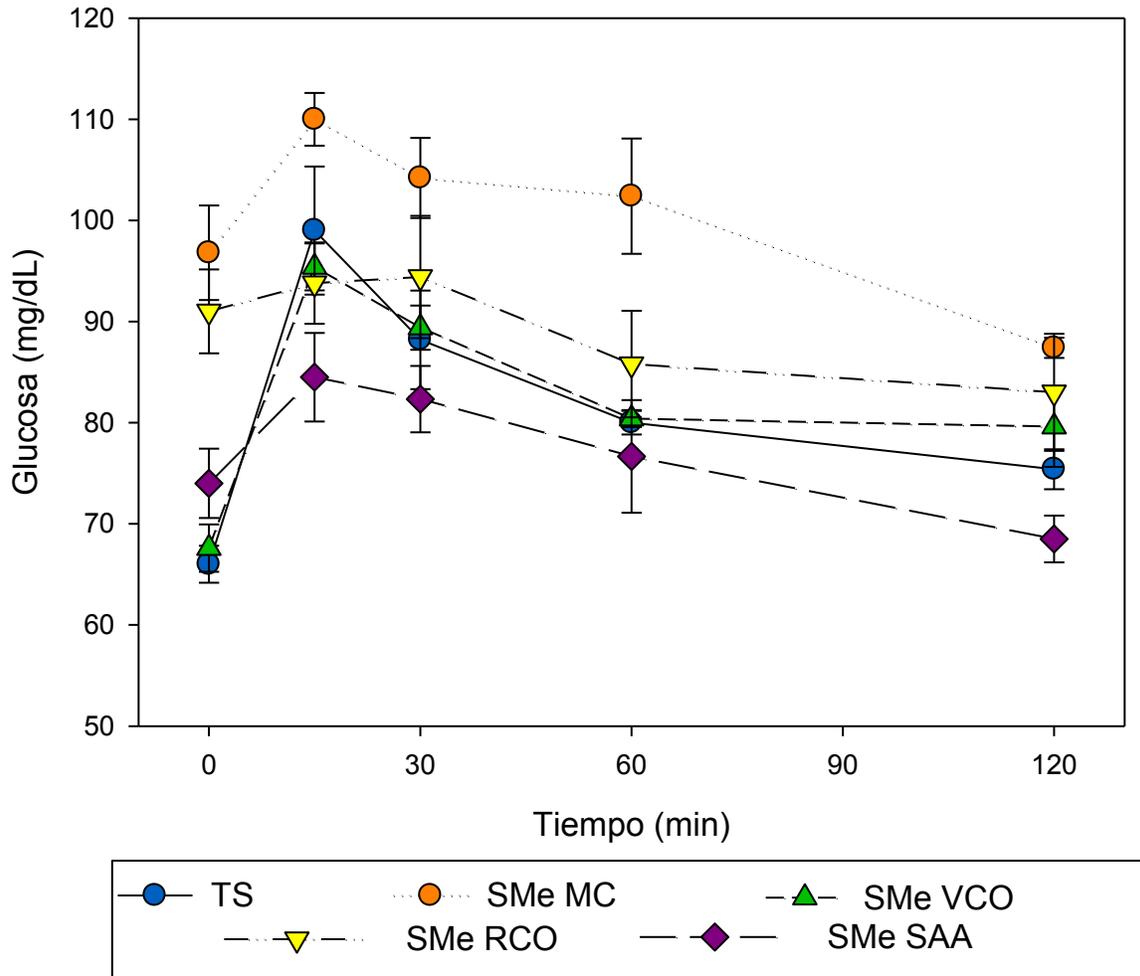


FIGURA 30. Curvas de tolerancia a la insulina

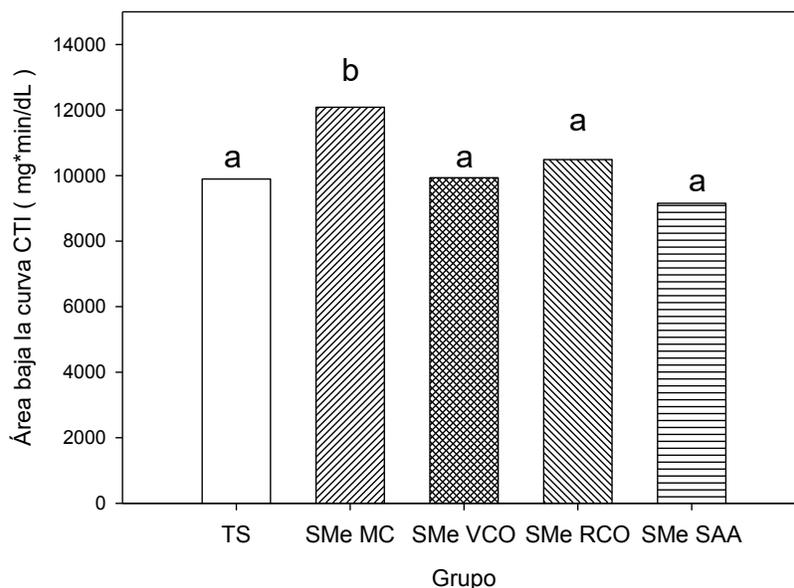


FIGURA 31. Ara bajo la curva de CTI

En la curva de tolerancia a la glucosa (figura 32) se observa que todos los grupos presentaron un patrón similar y solo el grupo SMe MC presentó un ligero cambio en el comportamiento, que al calcular el área bajo la curva (figura 33), no se observó una diferencia entre los grupos, esto puede corroborar el modelo de síndrome metabólico, y no el desarrollo de diabetes mellitus. En un trabajo realizado anteriormente autores encuentran que el consumo de una dieta alta en fructosa no provoca diabetes en 20 semanas, debido a que aunque la fructosa eleva los niveles de glucosa, no desarrolla la resistencia a la insulina tanto como el aceite de soya ⁽²⁶⁾. Existe un debate entre los crecientes casos de diabetes mellitus y el consumo de fructosa por el uso de jarabes fructosados en bebidas como jugos y refrescos ⁽⁸¹⁾⁽⁸²⁾.

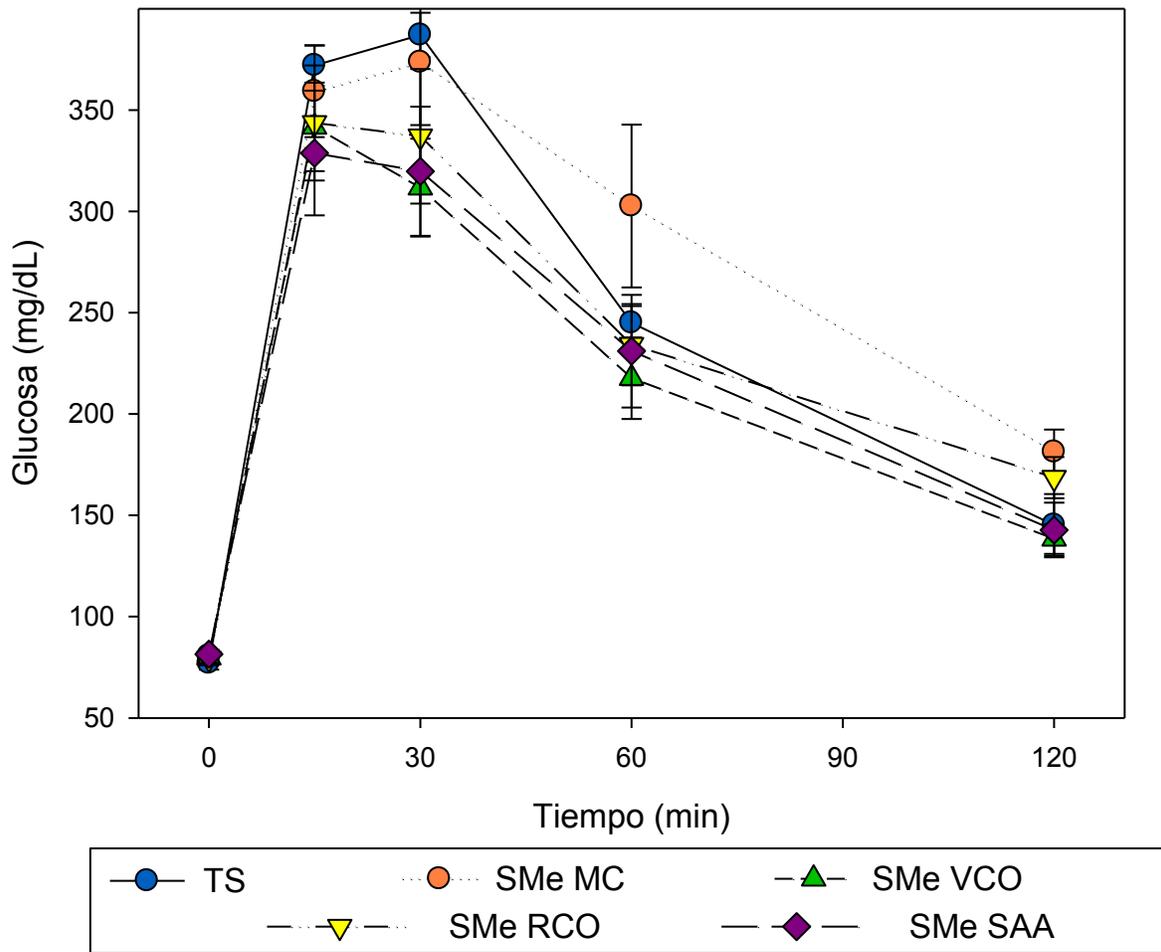


Figura 32. Curva de tolerancia a la glucosa

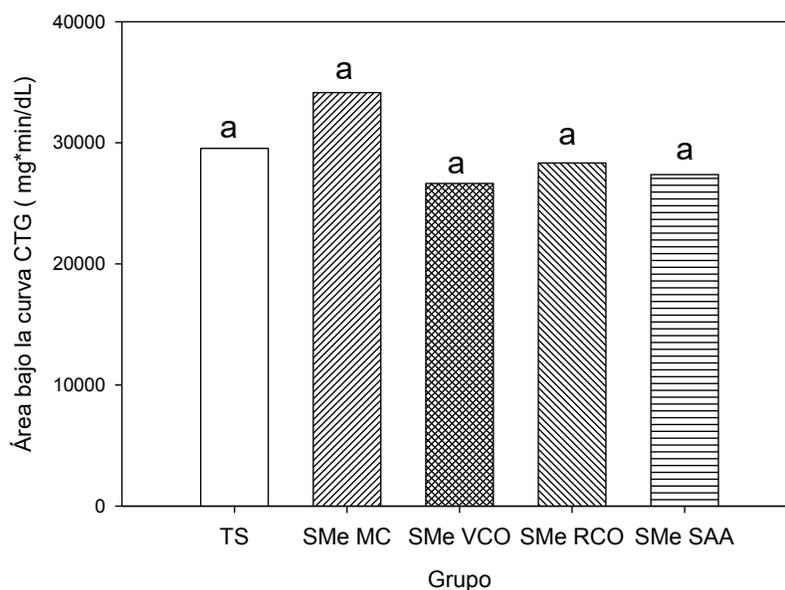


FIGURA 33. Área bajo la curva de CTG

3.7 Análisis de expresión relativa de PPAR γ y NPY

El cálculo de la expresión de los genes se realizó por el método comparativo que en este caso consiste en la comparación de la expresión del gen de PPAR γ de los grupos SMe MC, SMe VCO, SMe RCO y SMe SAA contra la expresión del gen PPAR γ en el grupo TS.

3.7.1 Expresión de PPAR γ en hígado

En la figura 34 se observa que los aceites de MC, VCO, no cambiaron la expresión de PPAR γ , que resulto igual a la expresión del grupo TS, usado como calibrador, Shamsi en 2014, encuentran que la expresión de PPAR γ aumenta a etapas tempranas de obesidad, seguida de una disminución de la expresión⁽⁸³⁾. En realidad la expresión de PPAR γ y la consiguiente activación como factor transcripcional conlleva a la expresión de genes para la producción de insulina y aumentar la sensibilidad a esta^{(6) (7) (8)}. En el hígado y tejido adiposo, el factor transcripcional

PPAR γ , está asociado con el metabolismo y biosíntesis de triacilglicéridos esto se puede comprobar por la expresión o activación de enzimas relacionadas ^{(19) (84)}. Se conoce que los ácidos grasos omega 3 aumentan y activan la expresión de PPAR γ ⁽⁷²⁾. Y en la figura 33, se observa que el grupo SMe SAA es el que presentó la mayor expresión de PPAR γ que puede estar relacionado con el mayor contenido de ácidos grasos DHA y EPA.

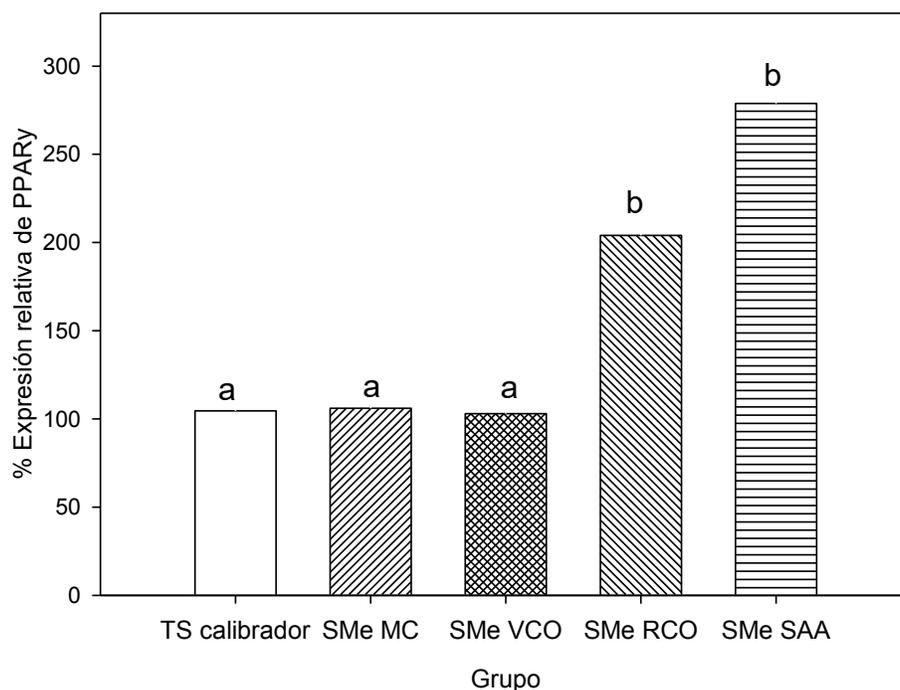


FIGURA 34. Porcentaje de expresión de PPAR γ en hígado

3.7.2 Expresión de PPAR γ en tejido adiposo epididimal

En la figura 35 se observa la expresión de PPAR γ en tejido adiposo epididimal, en donde vuelve a destacar una mayor expresión por parte del grupo SMe SAA. Existen estudios que asocian el incremento de la expresión de PPAR γ con problemas de obesidad, inflamación, por el hecho de estar relacionado con diferenciación de adipocitos y lipogénesis ^{(85) (86) (87)}. Sin embargo al estar relacionado PPAR γ con

algunas enzimas como por ejemplo la piruvato carboxilasa que interviene en la gliceroneogénesis ⁽¹⁹⁾ y ayudan a reducir la resistencia a la insulina al reducir el número de ácidos grasos libres en músculos y torrente sanguíneo ⁽¹⁸⁾. Sin embargo el grupo SMe VCO al no presentar una elevación en la expresión de PPAR γ y presentar una disminución de resistencia a la insulina, menor cantidad de triacilglicéridos y menor nivel de glucosa en sangre, esto indica que el VCO no realiza estos cambios a través del factor transcripcional PPAR γ .

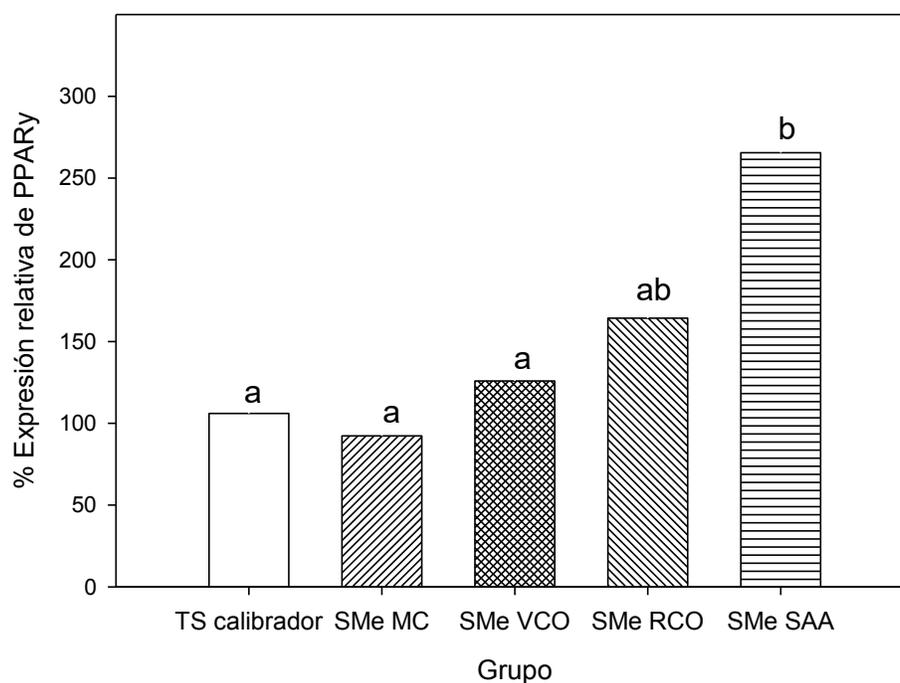


FIGURA 35. Porcentaje de expresión de PPAR γ en tejido adiposo epididimal

3.7.3 Expresión de NPY en hipotálamo

En la figura 36, se observa el porcentaje de expresión de NPY en los diferentes grupos tomando como grupo calibrador al TS, y aquí se observa que a excepción de SMe VCO, hubo una disminución de la expresión de NPY por parte de los grupos que ingirieron fructosa al 30 %, y si comparamos vs SMe MC observamos un

aumento de la expresión de un 53 % por parte del grupo SAA, 90% para SMe RCO y 142 % para SMe VCO, lo que indica que el aceite refinado y en especial el virgen aumenta la expresión de NPY llegando incluso a niveles de ratas sanas por el grupo SMe VCO.

La sobreexpresión de NPY por estar relacionado con la señal de hambre en el hipotálamo se asocia con problemas de salud, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y diabetes mellitus ^{(9) (10) (88) (89)}. Entre otros temas donde el NPY interviene están los ciclos circadianos ⁽¹¹⁾, el balance energético, aprendizaje, memoria, ansiedad, depresión, adicciones, y epilepsia ⁽⁹⁰⁾. Aunque la señal que transmite el NPY es de hambre en estudios se ha encontrado que una disminución del NPY provoca a su vez un desbalance que se asocia con hiperfagia, obesidad, resistencia a la insulina entre otros ^{(91) (92) (93)}.

La insulina y leptina inhiben la expresión de NPY, al encontrar que la expresión de NPY en el grupo SMe VCO es igual al del grupo sano, es posible concluir que los niveles de insulina bajaron para este grupo. Por otro lado se ha encontrado que ratas alimentadas con dosis altas de grasas y líneas celulares a las que se suministró glucosa reducen la expresión de NPY ^{(32) (34)}.

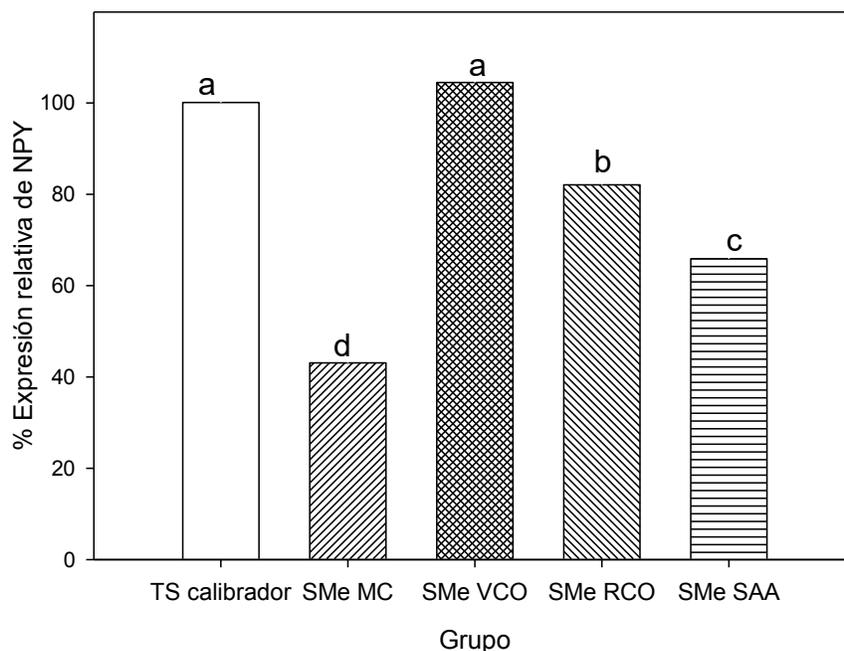


FIGURA 36. Porcentaje de expresión de NPY en hipotálamo

TABLA 10. Resumen de resultados concernientes al SMe

Grupo	Gluc. (mg/dL)	Col. (mg/dL)	Tri. (mg/dL)	AUC CTI (mg/min*dL)	PPARy hígado (% exp)	PPARy adiposo (% exp)	NPY hipotálamo (% exp)
TS	67.0	71.6	67.5	9897.8	104.6	106.0	100.1
SMe MC	94.6	81.3	252.8	12086.5	106.1	92.3	43.1
SMe VCO	67.7	73.5	165.9	9936.1	103.0	125.9	104.4
SMe RCO	90.5	95.4	225.4	10488.2	204.0	164.3	82.1
SMe SAA	72.4	66.2	202.5	9154.4	278.9	265.5	65.9

3.8 Discusión general

Se ha encontrado que las dietas altas en LCT son mayormente inductoras de SMe comparadas con la fructosa como inductor ⁽²⁶⁾, por el proceso de generación de

resistencia a la insulina ⁽¹⁷⁾, sin embargo se decidió utilizar fructosa como inductor de SMe, porque los compuestos a evaluar eran de naturaleza lipídica, y el mayor poder edulcorante de la fructosa generaría un mayor consumo a esta en los animales en comparación con la sacarosa por el placer del sabor dulce a menudo comparado con las drogas ⁽⁹⁴⁾.

El aceite de coco contiene ácidos grasos de cadena media en especial ácido láurico al cual se le atribuyen efectos para la producción de insulina ⁽⁷⁴⁾, junto a que al presentar una mejor absorción en el intestino y no necesitar transportador para pasar a través de las membranas la cantidad de ácidos grasos libres es menor que para los ácidos grasos de cadena larga ^{(28) (29)}. El VCO aparte de presentar estas propiedades potencializa su efecto por el alto contenido de fenoles, tocotrienoles, fitoesteroles, tocoferoles y otros compuestos no saponificables que evitan la oxidación y liberación de radicales libres mejorando los niveles de triacilglicéridos colesterol, evitando la formación de ateromas y reduciendo la constricción para reducir la presión arterial, mejorando diversos parámetros del síndrome metabólico ^{(95) (62) (25) (96) (75) (5) (21)}.

La reducción en la concentración de insulina, repercutió sobre la expresión de neuropéptido Y, y posiblemente compuestos del aceite de coco pudieron inducir la expresión a niveles sanos en el hipotálamo, el VCO no aumentó la expresión de PPAR γ sin embargo el RCO lo hizo y esto puede deberse a que en fases tempranas de obesidad la expresión de PPAR γ aumenta ⁽⁸³⁾.

El grupo SMe SAA presento una menor glucosa, colesterol, mayor sensibilidad a la insulina, estos efectos se le pueden atribuir en parte a la expresión de PPAR γ , su posterior activación y la inducción de genes para la producción de insulina en el páncreas, la activación de adipogénesis y lipogénesis en el tejido adiposo blanco y genes para la biosíntesis de triacilglicéridos en el hígado que en conjunto conlleva a reducir los ácidos grasos libres evitando la resistencia a la insulina, pero no llega a restablecer la expresión de NPY a niveles del grupo sano ^{(7) (8) (72) (69)}.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El aceite de coco tuvo efectos benéficos sobre el síndrome metabólico, siendo el VCO el que presentó mejores resultados. Los efectos del VCO sobre parámetros asociados al SMe son comparables con los obtenidos con el SAA.

Los ácidos grasos del VCO no promueven la expresión de PPAR γ , sin embargo restauran y posiblemente induzcan la expresión de NPY.

En base a los resultados obtenidos se deduce que los beneficios sobre el síndrome metabólico por parte del VCO resultan en parte por acción de los ácidos grasos de cadena media y potencializada por compuestos lipídicos no saponificables como polifenoles, tocotrienoles, fitoesteroles, tocoferol y β carotenos principalmente.

Además de ser agonistas de PPAR γ , los ácidos grasos del SAA, inducen la expresión de su gen en tejido adiposo epididimal e hígado.

4.2 Recomendaciones

Buscar una posible complementariedad entre el VCO y los ácidos grasos omega 3, porque actúan de diferente manera pero promueven resultados similares sobre el SMe.

Medir la expresión de melanocortina en el hipotálamo para corroborar el balance entre ambos y comprobar si el bloqueo de los receptores de melanocortina genera obesidad.

En trabajos recientes se ha evaluado medicamentos contra la epilepsia que actúan induciendo la expresión de NPY, y repercuten sobre diversas enfermedades, se recomienda investigar sobre la correlación entre el NPY y estos medicamentos para determinar si el VCO se puede implementar como un alimento funcional en este aspecto.

Bibliografía

1. **INEGI.** *Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido.* México : Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015.
2. *Medium-Chain Oil Reduces Fat Mass and Down-regulates Expression of Adipogenic Genes in Rats.* **Han, Jianrong, y otros, y otros.** 6, Boston, Massachusetts : OBESITY RESEARCH, 2003, Vol. 11.
3. *Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome.* **Nagao, Koji y Yanagita, Teruyoshi.** 208-212, s.l. : Pharmacological Research, 2010, Vol. 61. doi:10.1016/j.phrs.2009.11.007.
4. **alimentariux, Codex.** *Standard for named vegetable oils.* s.l. : codex stan 210-1999, 2015.
5. *Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol coadministered rats.* **Nevin, KG y T, Rajamohan.** 610-616, Thiruvananthapuram 695 581, India : Can. J. Physiol. Pharmacol., 2009, Vol. 87. doi: 10.1139/Y09-045.
6. *The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus.* **Gupta, D, Kono, T y Evans-Molina, C.** 1036-1047, Indianapolis, USA : Diabetes Obes Metab, 2010, Vol. 12.
7. *PPAR-c Activation Increases Insulin Secretion through the Up-regulation of the Free Fatty Acid Receptor GPR40 in Pancreatic β -Cells.* **Kim, H. S, y otros, y otros.** 1, Seoul, Korea : PLoS ONE, 2013, Vol. 8. e50128.
8. *PPAR γ activation restores pancreatic islet SERCA2 levels and prevents β cell dysfunction under conditions of hyperglycemic and Cytokine stress.* **Kono, T, y otros, y otros.** 2, Indiana, USA : Molecular Endocrinology, 2012, Vol. 26. 257-271.
9. *Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration.* **Barsh, G. S y Schwartz, M. W.** 589-600, California, USA : Nature reviews, 2002, Vol. 3.
10. **Nelson, D. L y Cox, M. M.** Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism. [aut. libro] L. A Lehninger. *Principios de Bioquímica.* s.l. : Omega, 2006.
11. *Feeding during the rest phase promotes circadian conflict in nuclei that control energy homeostasis and sleep-wake cycle in rats.* **Ramirez-Plascencia, O. D, y otros, y otros.** San Luis Potosí, México : Behavioral neuroscience, 2017.
12. **Alberti, KG, y otros, y otros.** *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International.* s.l. : Circulation, 2009.
13. **Gil, Angel.** *Tratado de Nutricion.* s.l. : ACCION MEDICA, 2005.
14. **WHO.** *The top 10 causes of death.* s.l. : World Health Organization, 2012.
15. *Role of insulin resistance in human disease.* **Reaven, Gerald M.** 1595-1607, s.l. : Diabetes, 1988, Vol. 37.
16. **Lam, David W. y LeRoith, Derek.** *Metabolic Syndrome.* [aut. libro] LJ Groot, P Beck Peccoz y G Chrousos. South Dartmouth : Endotext, NCBI Bookshelf, 2015.

17. *Cellular mechanisms of insulin resistance*. **Shulman, G. I.** 2, Connecticut, USA : The Journal of Clinical Investigation, 2000, Vol. 106. 171-176.
18. **Nelson, D. L y Cox, M. M.** Biosíntesis de lípidos. [aut. libro] A. L Lehninger. *Principios de Bioquímica*. s.l. : Omega, 2006.
19. *The Peroxisome Proliferator-activated Receptor-y regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro*. **Jitrapakdee, S, y otros, y otros.** 29, Inglaterra : The Journal of biological chemistry, 2005, Vol. 280. 27466-27476.
20. *Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation*. **Nevin, K.G. y T., Rajamohan.** 830-835, Thiruvananthapuram 695 581, India : Clinical Biochemistry, 2004, Vol. 37. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.04.010.
21. *Chemical Properties of Virgin Coconut oil*. **Marina, A.M. Che Man, Y.B. Nazimah, S.A.H y Amin, J.** 301-307, Selangor D.E., Malaysia : J Am Oil Chem Soc, 2009, Vol. 86.
22. *Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: Potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids*. **Turner, N, y otros, y otros.** 2547-2554, s.l. : Diabetes , 2009, Vol. 58.
23. *Lower Weight Gain and Higher Expression and Blood Levels of Adiponectin in Rats Fed Medium-Chain TAG Compared with Long-Chain TAG*. **Takeuchi, Hiroyuki, y otros, y otros.** 207-212, Kanagawa 239-0832, Japan : AOCS Press, 2006, Vol. 41.
24. *Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats*. **Kochikuzhyil, B.M., Devi, K y Fattepur, S.R.** 142-145, s.l. : Indian Journal of Pharmacology, 2010, Vol. 42. doi: 10.4103/0253-7613.66835.
25. *Cardioprotective effect of virgin coconut oil in heated palm oil diet-induced hypertensive rats*. **Kamisah, Y, y otros, y otros.** 1-7, s.l. : Pharm Biol, Early Online, 2015. ISSN 1388-0209 print/ISSN 1744-5116 online, DOI: 10.3109/13880209.2014.971383.
26. *Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver*. **Deol, Poonamjot, y otros, y otros.** Tennessee : PLoS ONE, 2015, Vol. 10. 10.1371/journal.pone.0132672.
27. **Rodríguez de la Concepción, Ma. Luisa.** *Diferenciación adipocitaria y factores reguladores de la biogénesis mitocondrial. Efecto de los fármacos antiretrovirales*. Barcelona : Tesis de Universitat de Barcelona, 2002.
28. *Absorption of Medium and Long Chain Triglycerides: Factors Influencing Their Hydrolysis and Transport*. **Greenberger, N. J, Rodgers, J. B y Isselbacher, J. 2,** Boston, USA : Journal of Clinical investigation, 1966, Vol. 45. 217-227.
29. *Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by high-fat diets in rats*. **Wein, S, y otros, y otros.** 185-194, s.l. : DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS, 2009, Vol. 25. DOI: 10.1002/dmrr.925.
30. *Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y el mantenimiento del balance energético* . **González Hita, M.E, Ambrosio Macias, K.G y Sánchez Enriquez, S.** 191-200, s.l. : Mediagraphics, 2006, Vol. 8.
31. *Central nervous system control of food intake*. **Schwartz, M. W, y otros, y otros.** 661-671, s.l. : Nature, 2000, Vol. 404.

32. *Various Dietary Fats Differentially Change the Gene Expression of Neuropeptides Involved in Body Weight Regulation in Rats.* **Dziedzic, B., y otros, y otros.** 364-373, s.l. : Journal of Neuroendocrinology, 2007, Vol. 19.
33. *Chronic Blockade of the Melanocortin 4 Receptor Subtype Leads to Obesity Independently of Neuropeptide Y Action, with No Adverse Effects on the Gonadotropic and Somatotropic Axes.* **Raposinho, P. D, y otros, y otros.** 12, Geneva, Switzerland : Endocrinology, 2000, Vol. 141. 4419-4427.
34. *Role of Neuronal Energy Status in the Regulation of Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase, Orexigenic Neuropeptides Expression, and Feeding Behavior.* **Lee, K, y otros, y otros.** 3-10, Ohaio, USA : Endocrinology, 2005, Vol. 146.
35. *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.* **Folch, Jordi, Lees, M y Sloane-Stanley, G.H.** 497-509, Boston, Massachusetts : J biol Chem, 1956, Vol. 226(1).
36. *Glucose.* **Kaplan, L.A.** 1032-1036, St Lois. Toronto. Princeton : Clim Chem The C.V. Mosby Co, 1984.
37. **Spinreact, S.A.** *Glucose-LQ.* Sant Esteve de Bas : s.n., 2014. BSIS46-1.
38. *The 4-Hydroxybenzoato / 4-Aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol .* **Meiattini, Franco, y otros, y otros.** 12, 2161-2165, s.l. : Clinical Chemistry, 1978, Vol. 24.
39. *Colesterol-LQ.* **Spinreact, S.A.** Sant Esteve de Bas : Ctra. Santa Coloma, 2013. BSIS48-E.
40. *Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes.* **Bucolo, Giovanni y David, Harold.** 5, North Torrey Pines Road : Clinical Chemistry, 1973, Vol. 19.
41. *Serum tryglicerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide.* **Fossati, Piero y Prencipe, Lorenzo.** 10, Milan, Italy : Clinical Chemistry, 1982, Vol. 28. 2077-2080.
42. **Spinreact, S.A.** *Triglicéridos-LQ.* Sant Esteve de Bas : Ctra. Santa Coloma, 2014. BSIS49-E.
43. *Chromogenic System for Measuring Hydrogen Peroxide: The Enzymatic Uric Acid Assay.* **Fossati, Piero y Prencipe, Lorenzo.** 5, Milan, Italy : Clinical Chemistry, 1980, 2010, Vol. 56. 865-866.
44. **A., Spinreact S.** *Ácido urico-LQ.* Esteve de Bas : Ctra. Santa Coloma, 2011. BSIS45-E.
45. *On the precipitate which produces picric acid in normal urine, and on a new reaction of creatinine.* **Jaffe, M.** 391-400, Konigsberg : Physiol Chem, 1886, Vol. 10.
46. *Creatinine in blood: analytical quality and influence on the estimation of Glomerula rFiltration Rate.* **Perazzi, Beatriz y Angerosa, Margarita.** 267-272, Buenos Aires, Argentina : Acta Bioquím Clín Latinoam, 2011, Vol. 45. ISSN 0325-2957.
47. **Salerno, Costantino.** *Appunti di Biochimica Clinica.* pagina web : Edizioni Nuova Cultura, 2011.
48. **S.A., Spinreact.** *Creatinine-J.* Sant esteve de Bas : Ctra. Santa Coloma, 2011. BSIS13-E.

49. **Gindler, E. M y Daskalakis, Olga.** *Determination of urea.* Patent : Sherwood Medical Company, 1984. US4474888 A .
50. **Spinreact, S.A.** *Urea-37.* Sant Esteve de Bas, España : Ctra. Santa Coloma, 2011. BSIS35-E.
51. *An assesment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin.* **Webster, D, Bignell, A.H.C y Attwood, E.C.** 101-108, Amsterdam : Clinica Chimica acta, 1974, Vol. 53. CCA 6388.
52. **Spinreact, S.A.** *Albumina.* Sant Esteve de Bas, España : Ctra Santa Coloma, 2011. BSIS02-E.
53. **Technologies, Life.** *Introducción a la PCR en tiempo real, Sistema StepOne y StepOne plus.* s.l. : Life Technologies.
54. —. *Introduccion al HRM (High resolution melting).*
55. *Comparison of RNA Extraction Methods for Molecular Analysis.* **Alves, MG, y otros, y otros.** 108-105, Sao Jose Dos Campos, Brazil : Acta Stomatologica Croatica, 2016, Vol. 50.
56. *DNaseI treatment is a prerequisite for the amplification of cDNA from episomal-based genes.* **Kienzle, N, y otros, y otros.** 612-616, Australia : Biotechniques, 1996, Vol. 20.
57. *Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation.* **Wiame, I, y otros, y otros.** 252-256, Heverlee, Belgica : Biotechniques, 2000, Vol. 29.
58. *Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats.* **Alberdi, G, y otros, y otros.** 29, España : Nutrition & Metabolism, 2011, Vol. 8.
59. *Hyperphagia induced by sucrose: Relation to circulating and CSF glucose and corticosterone and orexigenic peptides in the arcuate nucleus.* **Gaysinskaya, V. A, y otros, y otros.** 521-530, New York, USA : Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2010, Vol. 97.
60. *Use of immobilized phospholipase A1 catalyzed acidolysis for the production of structured phosphatidylcholine with an elevated conjugated linoleic acid content.* **Baeza-Jiménez, R, y otros, y otros.** 44-52, Veracruz, México : Grasas y aceites, 2012, Vol. 63 (1). ISSN 0017-3495.
61. *Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases .* **Simopoulos, A.P.** 502-507, Washington D.C. USA : ELSEVIER, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2006, Vol. 60.
62. *Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease.* **Gylling, H, y otros, y otros.** 346-360, Helsinki, Finland : Atherosclerosis , 2014, Vol. 232.
63. *Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective.* **Shahzad, N, y otros, y otros.** 786-794, Saudi Arabia : Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, Vol. 88.
64. *Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment (Review).* **Farina, N, y otros, y otros.** 1-57, s.l. : Cochrane Library, 2017, Vol. 4. CD002854.
65. **Alexander-Aguilera, A, y otros, y otros.** 350-357, Veracruz, Mexico : The journal of Nutritional Biochemistry, 2004, Vol. 15.
66. *Healthy effect of different proportions of marine ω -3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: lipidomic biomarkers of oxidative stress and*

- inflammation*. **Dasilva, G, y otros, y otros**. 1382-1392, Galicia, España : The Journal of Nutritional Biochemistry, 2015, Vol. 26.
67. *A study of the differential effects of eicosapentanoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA) on gene expression profiles of stimulated Thp-1 macrophages*. **Allam-Ndoul, B, y otros, y otros**. 424-442, Québec City, Canada : Nutrients, 2017, Vol. 9.
68. *Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome*. **Martínez-Fernández, L, y otros, y otros**. 24-41, Pamplona, España : Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2015, Vol. 121.
69. *Docosahexaenoic acid increases cellular adiponectin mRNA and secreted adiponectin protein, as well as PPAR γ mRNA, in 3T3-L1 adipocytes*. **Oster, R.T, y otros, y otros**. 783-789, Guelph, Canada : Appl. Physiol. Nutr. Metab., 2010, Vol. 35.
70. *Phytosterols Structured Algae oil Nanoemulsions and Powders: Improving Antioxidant and Flavor Properties*. **Chen, X.W, y otros, y otros**. 3694-3702, Guangzhou, China : Food & Function, 2016, Vol. 7. DOI: 10.1039/C6FO00449K.
71. *Obesity and liver disease*. **Scheen, A. J y Luyckx, F. H.** 4, Belgium : Best Practice Research & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002, Vol. 16. 703-716.
72. *Dietary n-3 PUFA protects mice from con a induced liver injury by modulating regulatory T Cells and PPAR- γ expression*. **Lian, M, y otros, y otros**. 1-16, Shanghai, China : PLoS ONE, 2015, Vol. 10. e0132741.
73. *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. **Quiñones, M, Miguel, M y Aleixandre, A.** 1, Madrid, España : Nutrición Hospitalaria, 2012, Vol. 27. 76-89.
74. *Insulinotropic potency of lauric acid: a metabolic rationale for medium chain fatty acids (MCF) in TPN formulation*. **Garfinkel, M, y otros, y otros**. 4, s.l. : Journal of Surgical Research, 1992, Vol. 52. 328-333.
75. *Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats*. **Nevin, K. G y Rajamohan, T.** e1-e8, India : European Society for Clinical Nutrition and Metabolism, 2008, Vol. 3.
76. *Variability in Fatty Acid and Triacylglycerol Composition of the Oil of Coconut (Cocos nucifera L.) Hybrids and Their Parentals*. **Laureles, L. R, y otros, y otros**. 1581-1586, Philippines : Journal of Agricultural and food chemistry, 2002, Vol. 50.
77. *Serum uric acid concentration is associated with hypertensive retinopathy in hypertensive chinese adults*. **Chen, X, y otros, y otros**. 83, China : BMC Ophthalmology, 2017, Vol. 17.
78. *Close linkage between serum uric acid and cardiac dysfunction in patients with ischemic heart disease according to covariance structure analysis*. **Tanaka, Y, y otros, y otros**. 2519, Japan : Scientific Reports, 2017, Vol. 7.
79. *The assessment of renal function in patients with newly diagnosed hypertension - the role of hyperuricemia as a risk factor for chronic kidney disease - preliminary study*. **Komendarek-Kowalska, M.** 251, Polonia : Polish Medical Journal, 2017, Vol. 42. 193-196.
80. *Change in serum albumin concentration is inversely and independently associated with risk of incident metabolic syndrome*. **Jin, S. M, y otros, y otros**.

- 1629-1635, Republic of Korea : METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL, 2016, Vol. 65.
81. *Dietary Sugar and Body Weight: Have We Reached a Crisis in the Epidemic of Obesity and Diabetes? We Have, but the Pox on Sugar Is Overwrought and Overworked.* **Kahn, R y Sievenpiper, J. L.** 957-962, North Carolina, USA : Diabetes Care, 2014, Vol. 37.
82. *Misconceptions about fructose-containing sugars and their role in the obesity epidemic.* **van Buul, V. J, Tappy, Luc y Brouns, F.J.P.H.** 119-130, Switzerland : Nutrition Research Reviews, 2014, Vol. 27.
83. *Effects of pioglitazone mediated activation of PPAR γ of CIDEA and obesity related changes in mice.* **Shamsi, B. H, y otros, y otros.** 1-9, China : PLOS ONE, 2014, Vol. 9. e106992.
84. **Kershaw, E. E, y otros, y otros.** E1736–E1745, Boston, USA : Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, Vol. 293.
85. *Adipogenesis at a glance.* **Lowe, C. E, O’Rahilly, S y Rochford, J. J.** 16, Inglaterra : Journal of cell Science, 2011, Vol. 124. 2681-2686.
86. *Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ .* **Tontonoz, P y Spiegelman, B. M.** 289-312, Los Angeles, USA : Annual Review of Biochemistry, 2008, Vol. 77.
87. *Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels .* **Yessoufou, A y Wahli, W.** w13071, Switzerland : Swiss Medical Weekly, 2010, Vol. 140.
88. *The metabolic syndrome in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons.* **Ailanen, L, y otros, y otros.** Finland : Society for the endocrinology, 2017.
89. *Current views on neuropeptide Y and diabetes-related atherosclerosis.* **Sun, W. W, y otros, y otros.** 0, China : Diabetes & Vascular Disease Research, 2017, Vol. 00.
90. *Therapeutic concentrations of valproate but not amitriptyline increase neuropeptide Y (NPY) expression in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line.* **Farrelly, L. A, y otros, y otros.** 123-130, Omaha, USA : Regulatory peptides, 2013, Vol. 186.
91. *Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats.* **Dube, M. G, y otros, y otros.** 38-46, Florida, USA : Brain research, 1999, Vol. 816.
92. *NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy.* **Kalra, S. P y S, Kalra P.** 201-211, Florida, USA : Neuropeptides , 2004, Vol. 38.
93. *Stimulation of Appetite by Ghrelin Is Regulated by Leptin Restraint: Peripheral and Central Sites of Action.* **Kalra, S. P, Ueno, N y Kalra, P. S.** 1331-1335, Florida, USA : The journal of nutrition, 2005, Vol. 135.
94. *Intense sweetness surpasses cocaine reward.* **Lenoir, M, y otros, y otros.** 8, Bordeaux, France : PLoS ONE, 2007, Vol. 2. e698.
95. *Virgin coconut oil improves hepatic lipid metabolism in rats- compared with copra oil, olive oil and sunflower oil.* **Arunima, S y Rajamohan, T.** 802-809, Thiruvananthapuram 695 581, India : Indian Journal of Experimental Biology, 2012, Vol. 50.

96. *Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil.* **Intahphuak, S., Khonsung, P. y Panthong, A.** 151-157, Thailand : Pharmaceutical Biology, 2010, Vol. 48. DOI: 10.3109/13880200903062614.

ANEXOS

Cromatogramas de perfil de ácidos grasos

En el cromatograma de la figura 37, se observa gráficamente la proporción tan grande de ácido oleico y linoleico comparándolo con el resto de los ácidos grasos que son imperceptibles a simple vista.

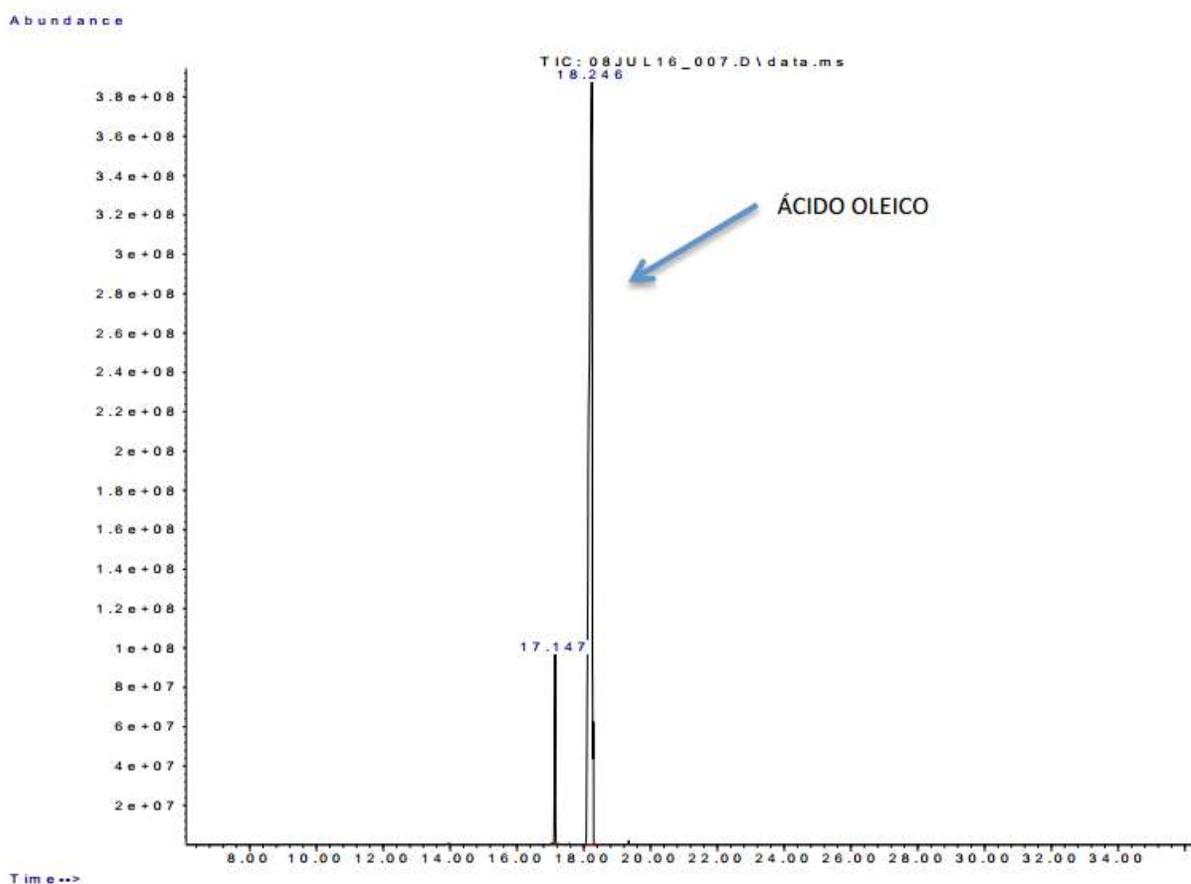


FIGURA 37. Cromatograma de aceite MC

En figura 38 se observa el cromatograma de aceite virgen de coco, que presento resultados muy similares al aceite refinado de coco donde el pico más alto es el contenido de ácido láurico.

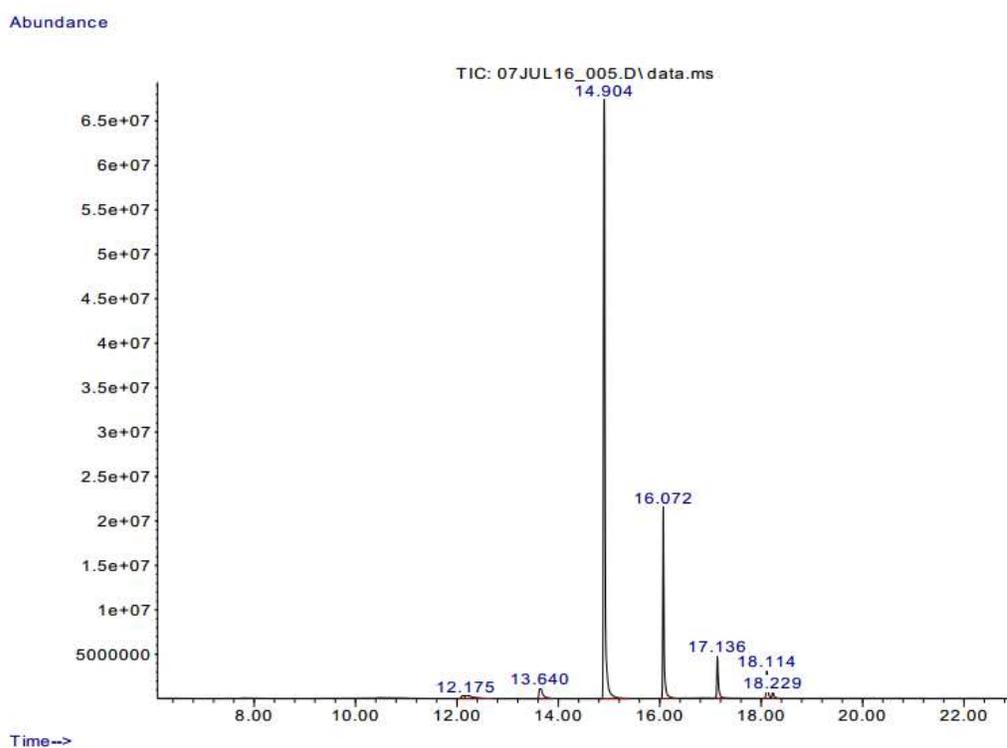


FIGURA 38. Cromatograma de aceite de virgen de coco

En la figura 39, se observa el contenido de ácidos grasos del suplemento de aceite de alga, con un mayor contenido de EPA y DHA.

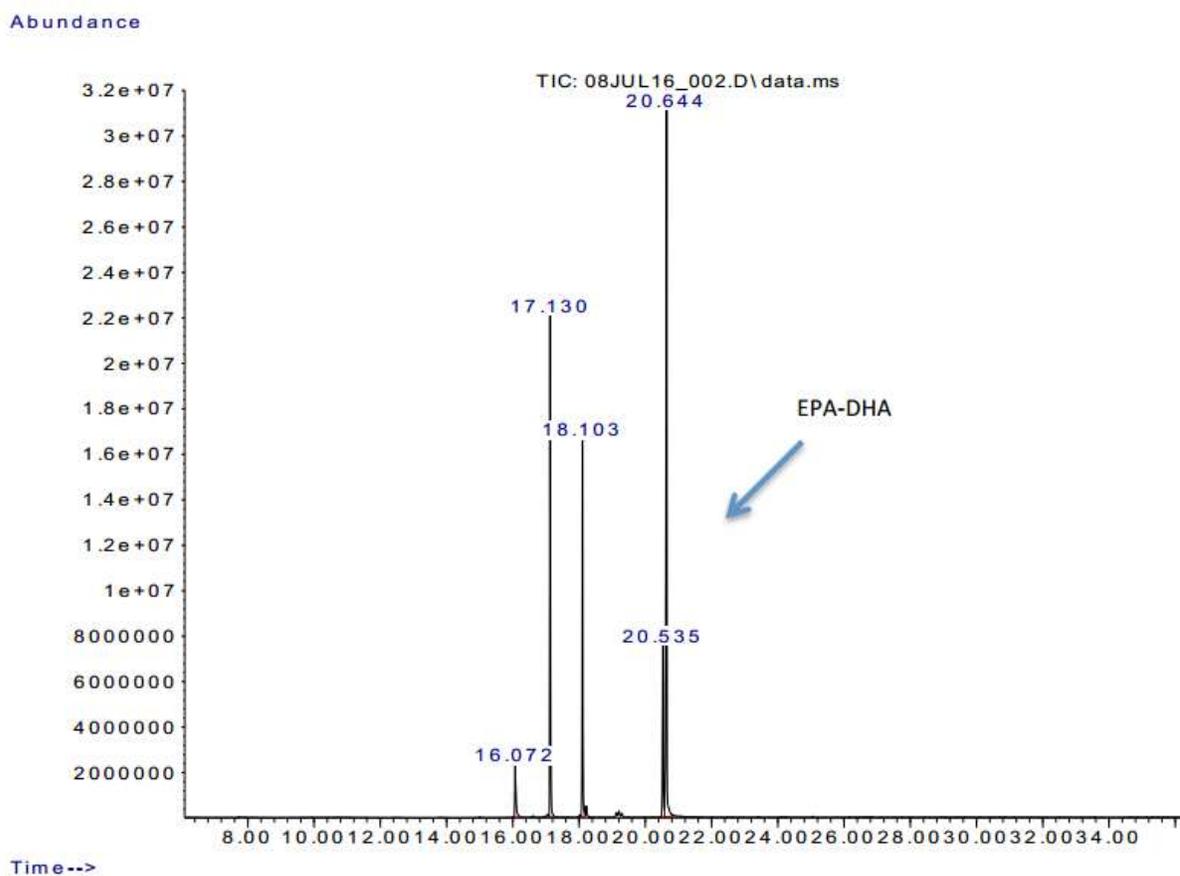


FIGURA 39. Perfil de ácidos grasos extraído de suplemento SAA.

Cromatogramas para cuantificación de fitoesteroles

Para la cuantificación de ácidos grasos se analizaron las muestras por duplicado resultando en cromatogramas muy similares, y para no provocar tedio solo se muestra uno de los cromatogramas de cada muestra.

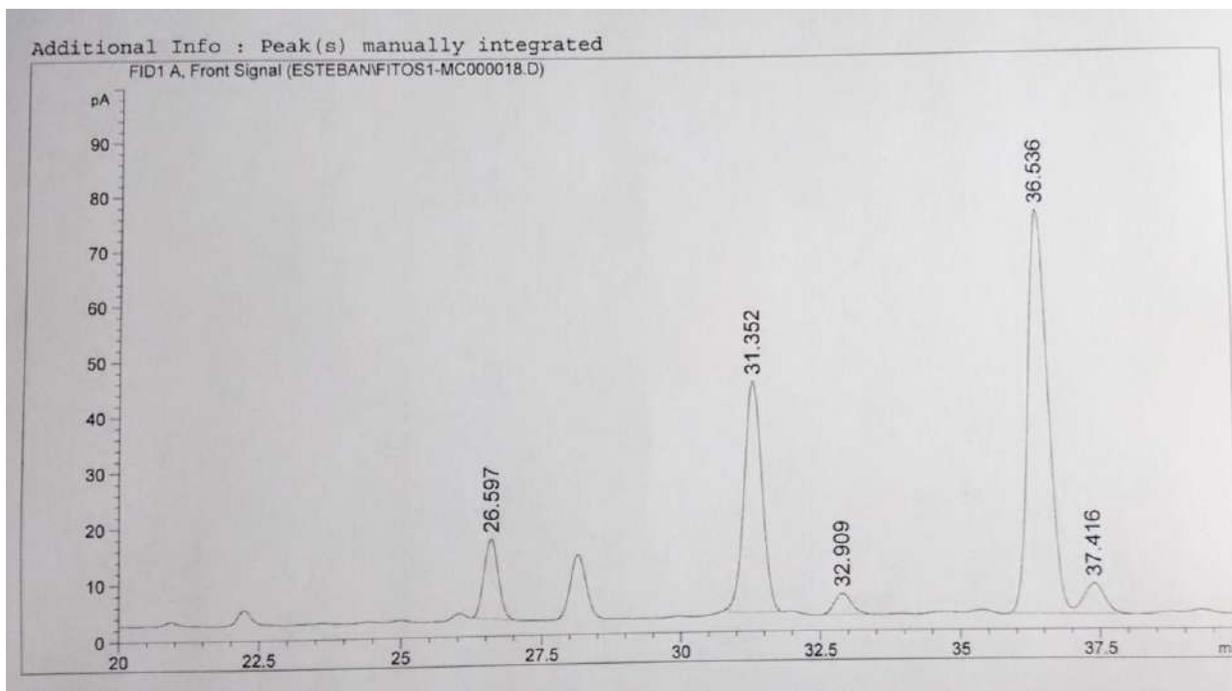


FIGURA 40. Cromatograma de parte no saponificable de mezcla MC

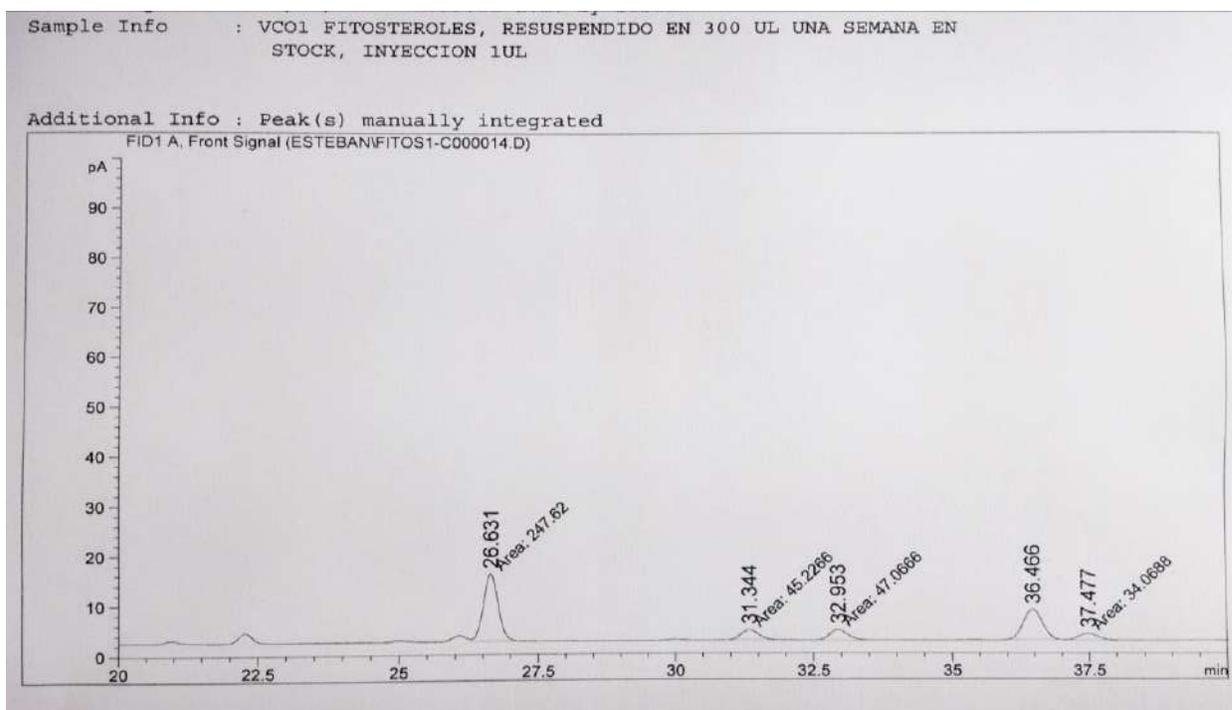


FIGURA 41. Cromatograma de parte no saponificable de VCO

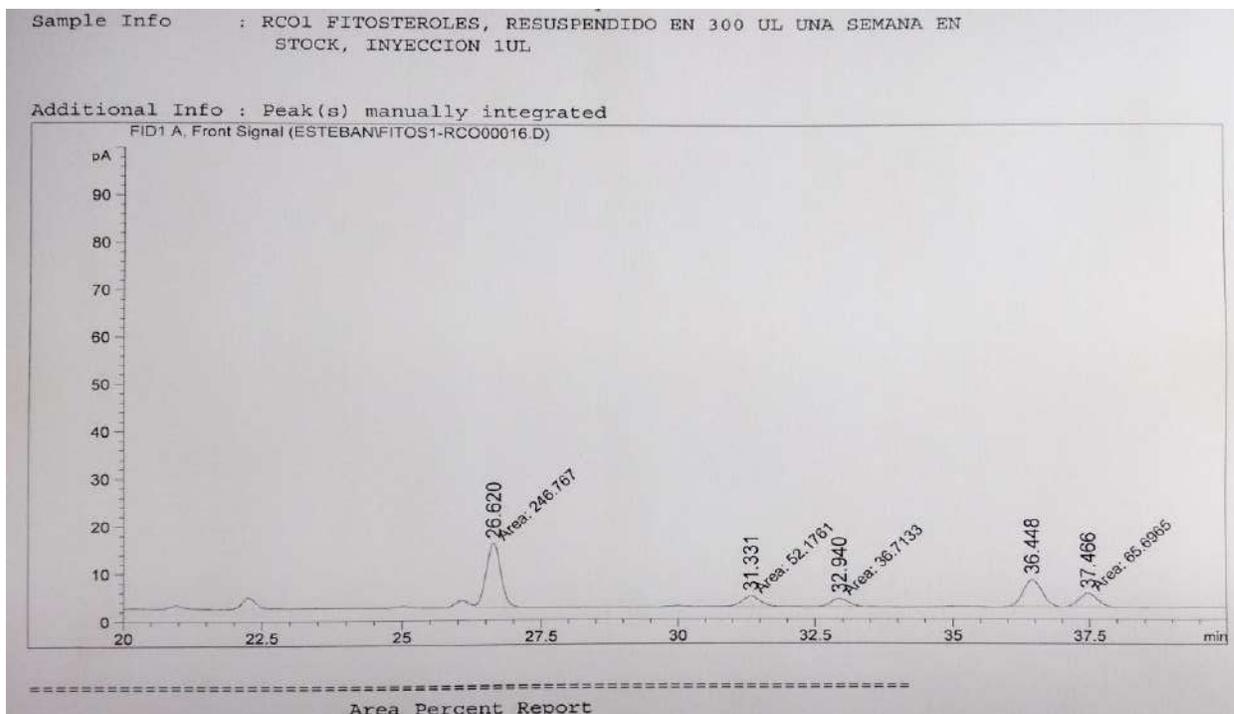


FIGURA 42. Cromatograma de parte no saponificable de RCO

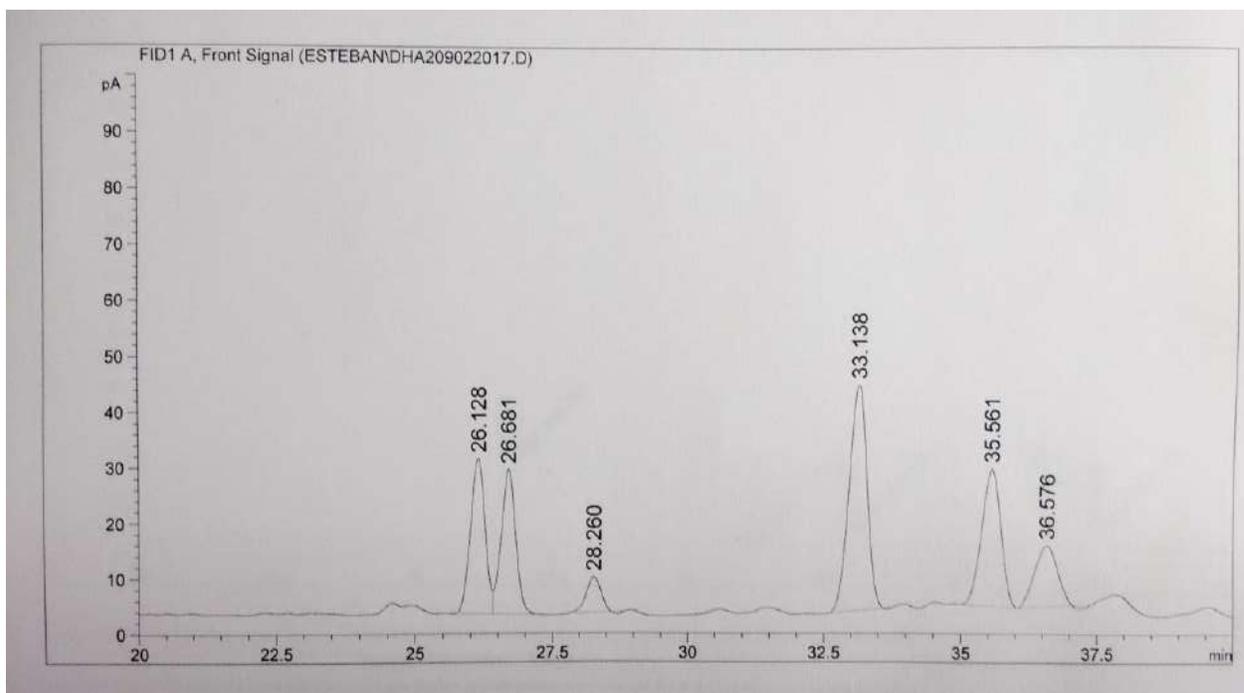


FIGURA 43. Cromatograma de parte no saponificable de SAA

Emulsión de aceites

Las emulsiones de los aceites se realizaron pesando **5.152 g** de aceite o suplemento, se añadió **0.36 mL** de tween 20, se aforó a un volumen de **12 mL** con agua y se agitó en vortex. Se administró 1.5 mL de estas emulsiones en una sola exhibición a cada rata por día.

Recolección de muestras

La recolección de las muestras de sangre o tejidos se realizó durante el sacrificio, las ratas fueron puestas en ayuno 10 horas antes del sacrificio y la sangre fue extraída de arteria, centrifugada y se separó el suero sanguíneo, se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso en cada análisis sérico realizado.

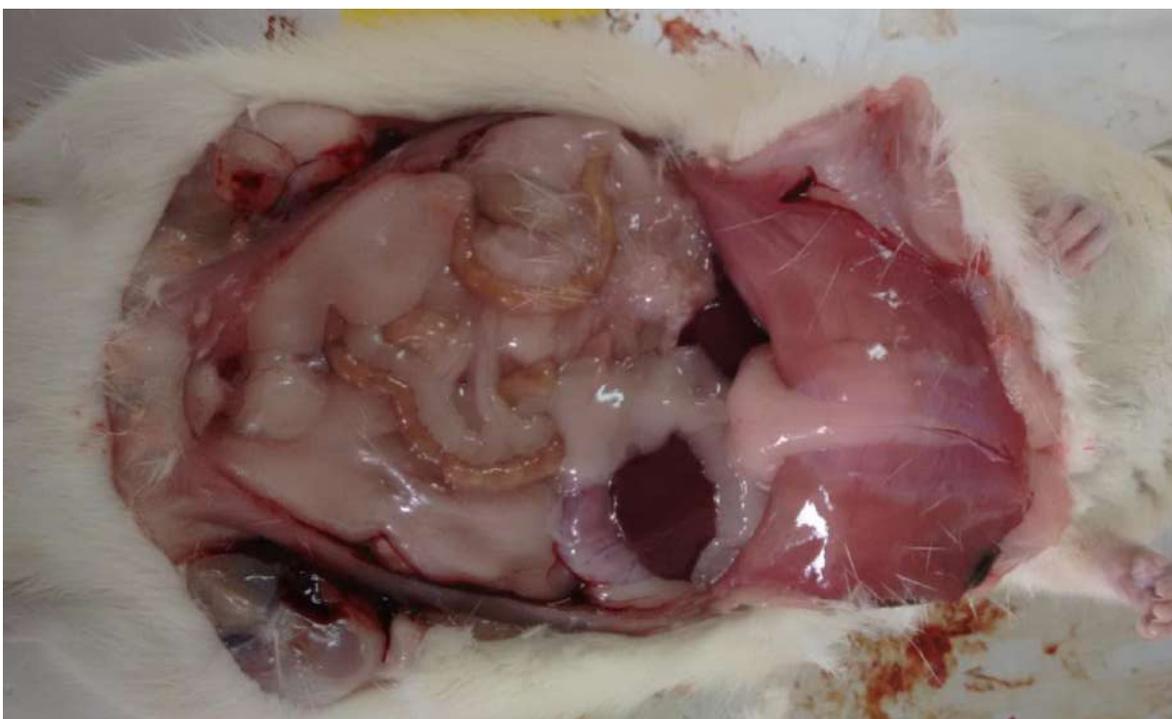


FIGURA 44. Fotografía de una rata del experimento antes de recolectar los órganos

Se recolectó el hipotálamo, hígado, tejido adiposo epididimal, intercostal, visceral y epicardico, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C.



FIGURA 45. Hígado antes de congelar en nitrógeno líquido



FIGURA 46. Cerebro antes de extraerle el hipotálamo

Resultados de RNA

Las muestras de los tejidos congelados fueron trituradas en un mortero de acero con nitrógeno líquido para facilitar la posterior extracción y evitar la degradación por temperatura.



FIGURA 47. Mortero de acero para triturar organos

TABLA 11. Lecturas de concentración de RNA, extraído de tejido adiposo

No	TS (ng/μL)	SMe MC (ng/μL)	SMe VCO (ng/μL)	SMe RCO (ng/μL)	SMe SAA (ng/μL)
1	387.33	191.10	468.43	314.73	242.43
2	837.43	631.80	197.73	362.00	526.30
3	486.37	155.27	887.27	269.63	159.03
4	629.33	968.10	351.63	172.47	182.93
5	286.90	1072.50	912.43	537.73	147.67
6	1020.33	184.33	298.43	1359.30	453.50
7	2434.03	193.03	900.70	805.40	390.80
8	464.77				

TABLA 12. Lecturas de concentración de RNA, extraído de hígado

No	TS (ng/μL)	SMe MC (ng/μL)	SMe VCO (ng/μL)	SMe RCO (ng/μL)	SMe SAA (ng/μL)
1	455.00	1536.93	1666.57	987.87	2046.57
2	144.40	1361.47	1864.23	1068.60	1403.70
3	771.97	1498.03	1653.17	1462.83	1325.77
4	974.80	1160.77	1110.60	985.77	1422.10
5	1826.40	1151.17	972.30	1753.27	1100.00
6	722.43	1606.23	1305.67	1122.40	1731.93
7	1655.90	1317.70	1992.30	1223.80	2427.40
8	1820.60				

TABLA 13. Lecturas de concentración de RNA, extraído de hipotálamo

No	TS (ng/μL)	SMe MC (ng/μL)	SMe VCO (ng/μL)	SMe RCO (ng/μL)	SMe SAA (ng/μL)
1	675.07	779.13	1098.73	733.00	992.53
2	808.70	1120.43	754.57	972.43	596.27
3	1594.33	1055.97	655.70	1213.93	726.87
4	949.07	1136.23	1070.37	1077.70	909.97
5	773.30	1201.57	722.83	1085.30	1061.83
6	849.00	871.57	1358.93	678.77	1219.30
7	1474.00	1093.33	841.87	988.63	763.43
8	978.17				

Geles de agarosa

Los geles de agarosa se realizaron al 1 % (p/v) de agarosa y se utilizó 1 μL de bromuro de etidio por cada 30 μL de solución. Al observar el RNA extraído de los tejidos en un gel de agarosa, podemos observar dos bandas definidas (28S y 18S). En las siguientes imágenes podemos deducir que las muestras de RNA extraído donde se observen las dos bandas definidas se encuentran en buenas condiciones. Las muestras que no presentaban las dos bandas de RNA en el gel de agarosa se volvieron a extraer.

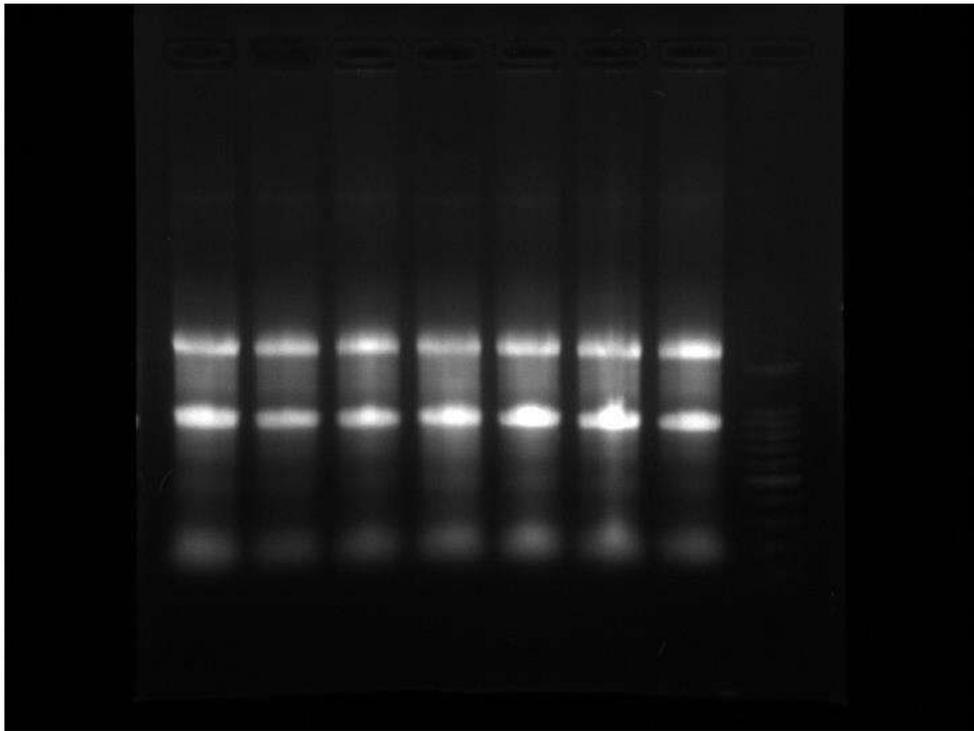


FIGURA 48. Muestras de RNA extraído del hipotálamo

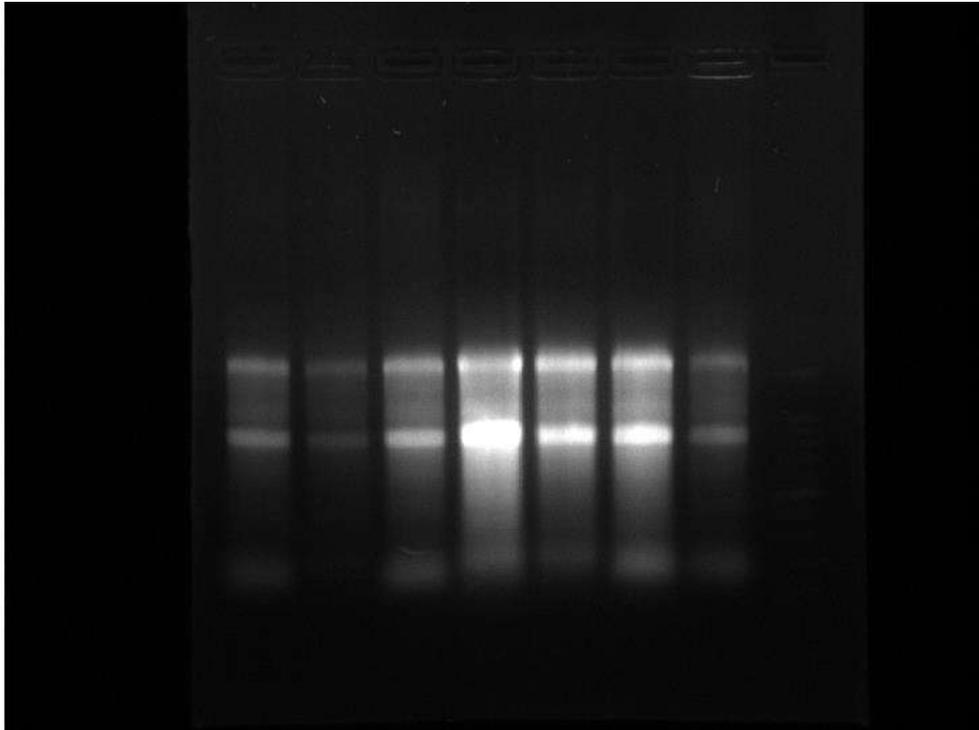


FIGURA 49. Muestras de RNA extraído de tejido adiposo epididimal

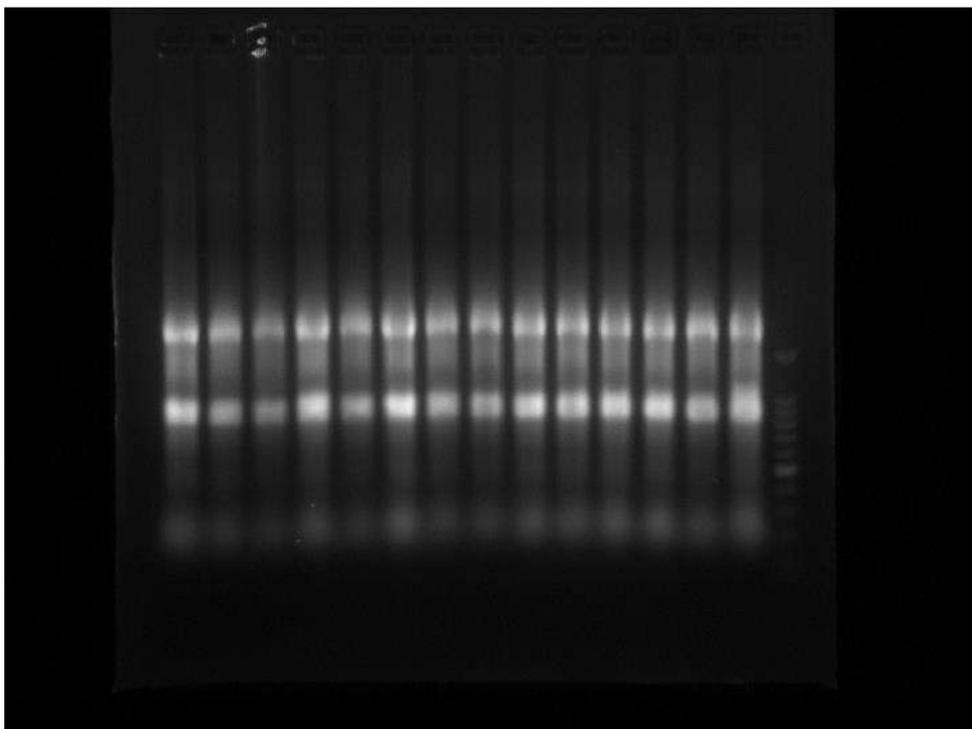


FIGURA 50. Muestras de RNA extraído de hígado

Se realizaron pruebas preliminares en PCR para comprobar que los amplicones presentaban el tamaño adecuado correspondiente a su par de primers. En la figura 51, se observa una sola banda, sin embargo en los NTC se presentan ciertas bandas que no deberían estar. Por lo cual se aumentó el Tm de 60 °C a 61 °C. Las bandas del primer y tercer pozo se encuentran en el lugar que corresponden, es decir 99 pb para β actina y 339 para PPAR, el marcador molecular utilizado es de 100 a 1000 pb con una banda extra de 1500 pb. En el equipo para RT PCR se corroboró que no había productos inespecíficos con la melt curve.

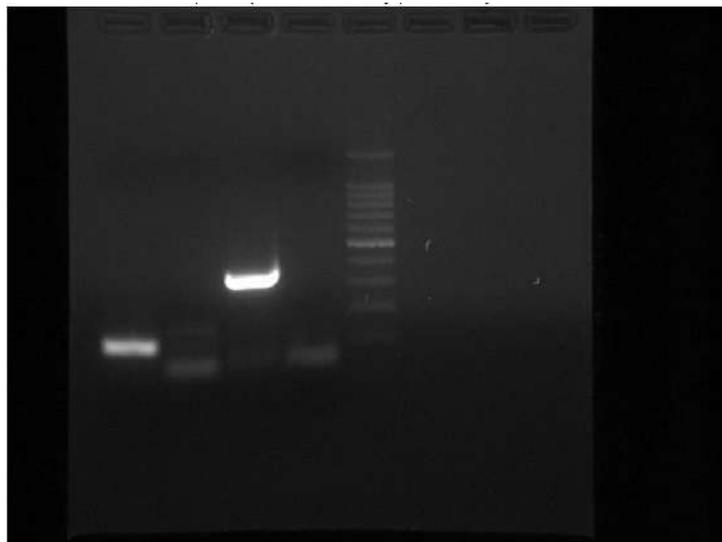


FIGURA 51. PCR de β actina, NTC de β actina, PPAR γ , NTC de PPAR γ y marcador

En la figura 52, se aprecia como en el carril 2 y 6 se observan bandas definidas que corresponden a la amplificación de los primers de β actina y NPY donde este último tiene una longitud de 75 pb.

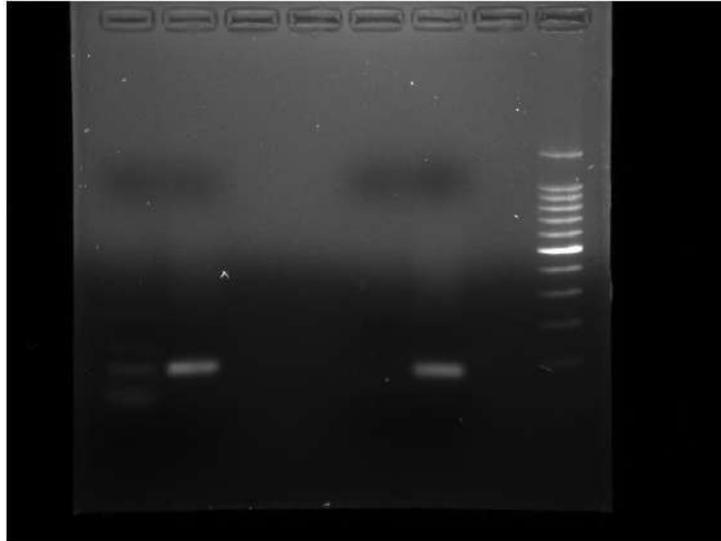


FIGURA 52. NTC de β actina, β actina, NTC de NPY y gen NPY

Curvas de eficiencia para RT-PCR

Para realizar las curvas de eficiencia se partió de 0.25 μ L de cDNA disueltos en 1.3 μ L de agua libre de nucleasas y se realizaron diluciones seriadas 1:10 para cada par de primers (β actina, PPAR γ , NPY) y se sometieron a las mismas condiciones a las cuales se sometieron las muestras.

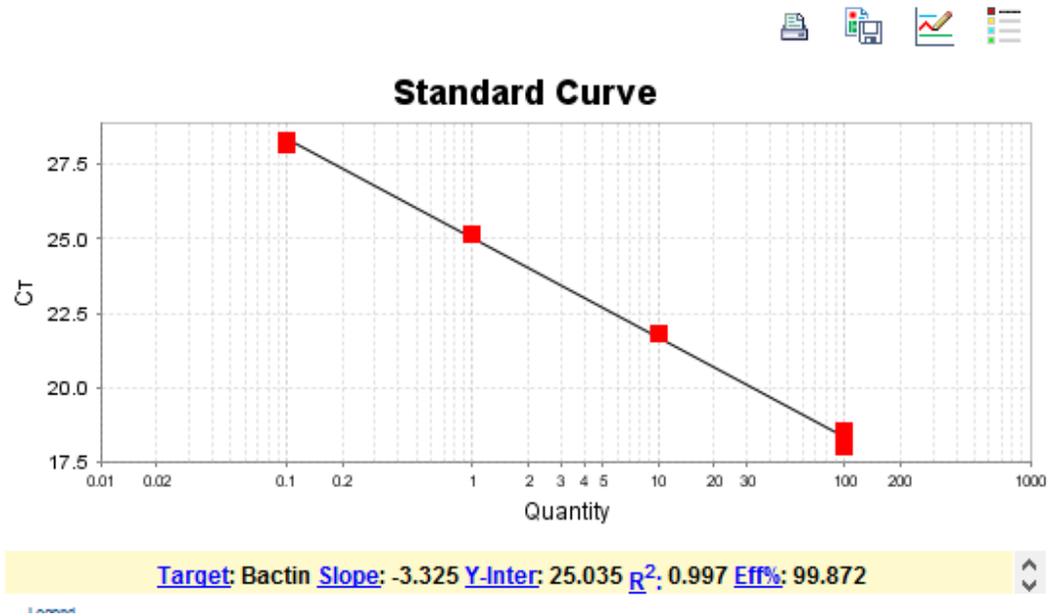


FIGURA 53. Curva de eficiencia para β -actina

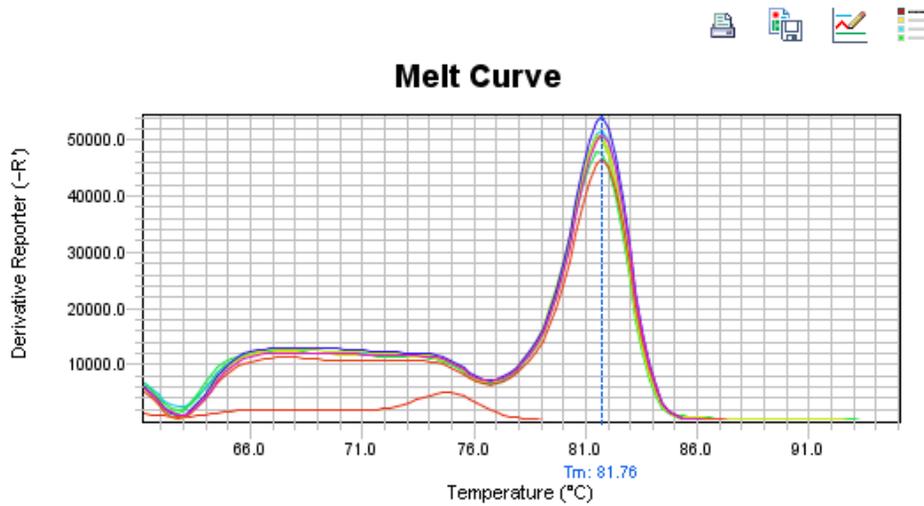
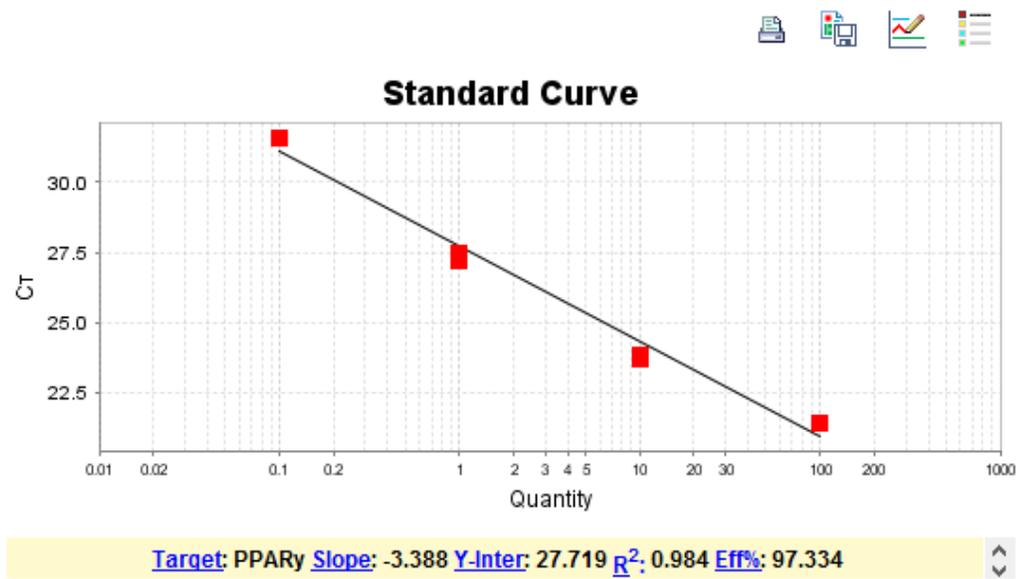
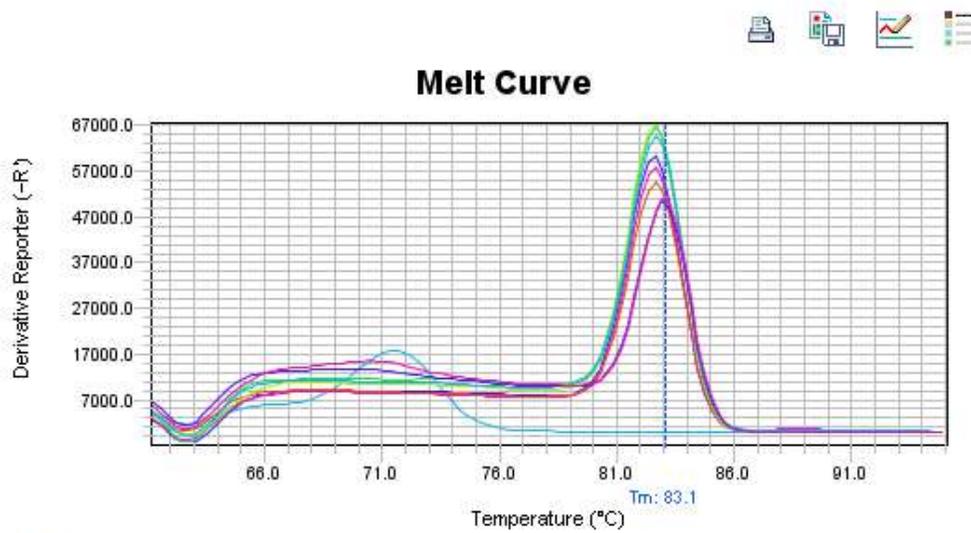


FIGURA 54. Melt curve de la curva de eficiencia de β - actina

FIGURA 55. Curva de eficiencia para PPAR γ FIGURA 56. Melt curve de la curva de eficiencia de PPAR γ

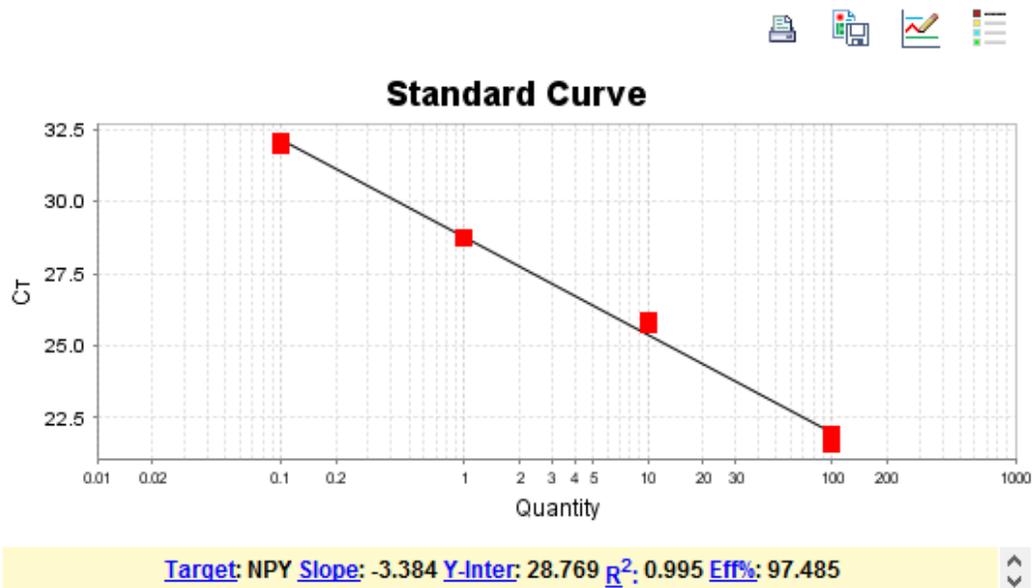


FIGURA 57. Curva de eficiencia para NPY

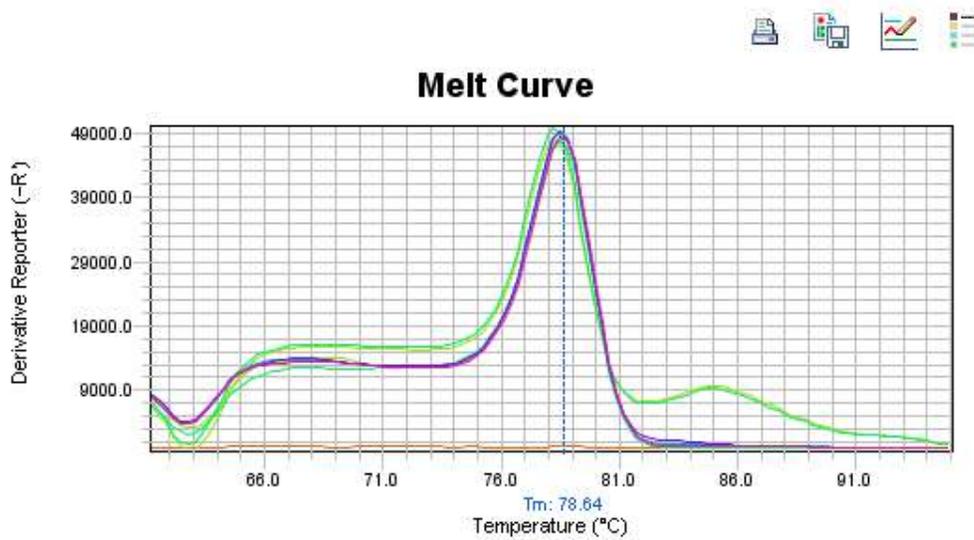


FIGURA 58. Melt curve de la curva de eficiencia de NPY

Aceites y suplementos utilizados

En la figura 59, se observan los aceites de maíz y canola que posteriormente se mezclaron para administrarse. Se mantuvieron protegidos de la luz y a temperatura ambiente (25 °C).



FIGURA 59. Aceites utilizados para administrar al grupo SMe MC

En la figura 60, se observa el aceite virgen de coco utilizado para este experimento, que fue adquirido en una tienda COSTCO y almacenado a 4°C durante todo el experimento.



FIGURA 60. Aceite virgen de coco

En la figura 61, se observa el aceite refinado de coco implementado durante el experimento, y que fue proporcionado por la empresa “FABRICACIÓN Y VENTA DE GRASAS Y ACEITES VEGETALES AAK MÉXICO S.A. de C.V.” y que fue sellado al vacío, protegido de la luz y almacenado a 4°C para evitar su oxidación.



FIGURA 61. Aceite refinado de coco

En la figura 62 se observa el suplemento de aceite de alga nombrado “Life’s DHA™ S10-P200”, comprado a la empresa “GRUPO HARMONY ONE STEP SOLUTION”, se almacenó a 4°C antes y durante todo el experimento, en la figura 61 se describe su composición.



FIGURA 62. Suplemento de aceite de alga



Product Information

life'sDHA™ S10-P200

Ingredient Statement

Ingredients: Glucose syrup solids, algal oil, modified corn starch, mannitol, sodium ascorbate, and 2% or less of sodium polyphosphate, glycerol mono- and di-stearate, tricalcium phosphate, high oleic sunflower oil, sunflower lecithin, natural flavors, mixed natural tocopherols and ascorbyl palmitate (as antioxidants).

Glucose Syrup Solids	30 - 40 %
Algal Oil	30 - 40 %
Modified Corn Starch	20 - 25 %
Mannitol	5 - 10 %
Sodium Ascorbate	1 - 5 %
Sodium Polyphosphate	< 2.0 %
Glycerol Mono- and Di-stearate	< 2.0 %
Tricalcium Phosphate	< 2.0 %
High Oleic Sunflower Oil	< 2.0 %
Sunflower Lecithin	< 2.0 %
Natural Flavors	< 2.0 %
Mixed Natural Tocopherols	< 2.0 %
Ascorbyl Palmitate	< 2.0 %

FIGURA 63. Composición del suplemento de aceite de alga

En la figura 64, se observa el equipo StepOne utilizado para realizar la expresión relativa de los genes de PPAR γ y neuropéptido Y



FIGURA 64. Equipo Step One de Applied biosystems

En la figura 63, se observa el cromatógrafo de gases utilizado para la medición de fitoesteroles.



FIGURA 65. Cromatógrafo de gases 7820A (G4350A)