



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS E INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**



**“Efecto de la Suplementación Dietética de Ácidos Grasos N-3
sobre la Expresión de los Genes Scd1, Scd5, Elongasa 5 Y
Elongasa 6 en Individuos Obesos de 10 A 16 Años”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

LN. GRISEL OLIVARES MORENO

DIRECTORES:

DR ÁNGEL MILIAR GARCÍA
DR. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ

MÉXICO, D.F. JUNIO 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 20 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Efecto de la Suplementación Dietética de Ácidos Grasos Omega 3 sobre la Expresión de los Genes de SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 en Individuos Obesos de 10 a 16 años.”

Presentada por la alumna:

| Olivares | Moreno | Grisel |
|------------------|------------------|---------------|
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre(s) |

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 9 | 1 | 2 | 8 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Ángel Miliar García

Dr. Aarón Domínguez López

Dra. Norma Estela Herrera
González

Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias

M. en C. Evangelina Muñoz Soria

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 del mes mayo del año 2011, el que suscribe Olivares Moreno Grisel alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091288 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ángel Miliar García, Dr. Aarón Domínguez López y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de la Suplementación Dietética de Ácidos Grasos Omega 3 sobre la Expresión de los Genes de SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 en Individuos Obesos de 10 a 16 años”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección olivares_moreno@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Grisel Olivares Moreno

Nombre y firma

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio del Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán durante el periodo de marzo a octubre de 2010.

El proyecto estuvo bajo la dirección del Dr. Ángel Miliar García y del Dr. Aarón Domínguez López.

La estudiante contó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Registro 330414.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado.

A los Directores del proyecto Dr. Ángel Miliar y Dr. Aarón Domínguez.

A la Dra. Blanca del Río Navarro y a los integrantes del Departamento de Alergias del Hospital Infantil Federico Gómez.

Al comité tutorial Dra. Evangelina Muñoz, Dra. Gisela Gutiérrez y Dra. Norma Herrera.

A todos los participantes del proyecto.

ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| μ L | Microlitros |
| ACC | Acetil Carboxilasa |
| AGPI | Ácidos grasos poli insaturados |
| AHA | Asociación Americana del Corazón |
| ALA | Ácido linolénico |
| Apo | Apolipoproteína |
| BAT | Tejido adiposo pardo |
| CDC | Centro de Control de Enfermedades |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria |
| ChREBP | Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos |
| cm | Centímetros |
| COX | Ciclooxigenasa |
| CP | Cross Point |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DHA | Ácido docosahexanoico |
| dL | Decilitros |
| dNTPs | Desoxirribonucleotidos trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| ELOVL | Elongasa |
| ENSANUT | Encuesta Nacional de Salud y Nutrición |
| EPA | Ácido eicosapentanoico |
| FAS | Sintasa de ácidos grasos |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HIMFG | Hospital Infantil de México Federico Gómez |
| IMC | Índice de masa corporal |
| INCMNSZ | Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán |
| Kcal | Kilocalorías |
| LA | Ácido linoleico |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LOX | Lipooxigenasa |
| LPL | Lipoproteín lipasa |
| LTB | Leucotrienos |
| LXR | Receptor hepático X |
| mg | Miligramos |
| MLX | Factor parecido a Max |
| mM | MicroMolar |
| MOPS | Ácido 3-N-monofolino-propanesulfónico |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |

| | |
|--------------|---|
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PGE | Prostaglandinas |
| pmol | picomol |
| PPAR | Receptor activado del proliferador de peroxisomas |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SCD | Esteroil Coenzima A Desaturasa |
| SREBP | Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides |
| TXA | Tromboxano |
| UCP | Proteína desacoplante |
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |
| WAT | Tejido adiposo blanco |
| n-6 | Omega 6 |
| n-3 | Omega 3 |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| TNF α | Factor de Necrosis Tumoral Alfa |
| MCP-1 | Proteína Quimioatrayente de monocitos 1 |

INDICE

| | |
|--|----|
| Índice de Figuras | 10 |
| Índice de Tablas | 10 |
| Índice de Gráficas..... | 11 |
| 1. Resumen | 12 |
| 2. Abstract | 13 |
| 3. Introducción..... | 14 |
| 4. Marco Teórico | 19 |
| 4.1. Obesidad Pediátrica | 19 |
| 4.2. Tejido Adiposo | 25 |
| 4.3. Ácidos Grasos Poliinsaturados | 27 |
| 4.3.1. Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega 3. | 31 |
| Efectos metabólicos de los AGPI n-3 | 32 |
| Hipertrigliceridemia..... | 33 |
| Inflamación | 34 |
| Regulación de la expresión génica | 34 |
| Adipogénesis regulada por AGPI..... | 35 |
| 5. Planteamiento del Problema..... | 44 |
| 6. Justificación..... | 44 |
| 7. Hipótesis..... | 45 |
| 8. Objetivos..... | 45 |
| 9. Material y Métodos..... | 46 |
| 9.1. Tipo de estudio | 46 |
| 9.2. Delimitación en espacio y tiempo..... | 46 |
| 9.3. Población y muestra | 46 |
| 9.4. Criterios de inclusión | 46 |
| 9.5. Criterios de exclusión | 47 |
| 9.6. Criterios de eliminación | 47 |
| 9.7. Evaluación y Seguimiento..... | 48 |
| Evaluación Inicial..... | 48 |
| Monitoreo..... | 48 |
| Evaluación Final | 49 |
| 9.8. Técnicas y procedimientos..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Prescripción dietética y entrega del suplemento de AGPI n3 | 49 |
| Antropometría y composición corporal | 50 |
| Toma de biopsia de tejido adiposo | 51 |
| Muestra de sangre..... | 52 |
| Análisis de la expresión génica..... | 52 |
| 9.9. Definición de las variables y unidades de medida..... | 62 |
| 9.10. Técnicas de análisis estadístico | 64 |
| 9.11. Consideraciones éticas..... | 65 |
| 10. Resultados..... | 65 |
| 11. Discusión | 80 |
| 12. Conclusiones | 82 |
| 13. Perspectivas | 83 |
| 14. Referencias bibliográficas | 84 |
| Anexos..... | 89 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Principales Ácidos Grasos Poliinsaturados n-3 y n-6. | 28 |
| Figura 2 Metabolismo de los AGPI n-3 y síntesis de eicosanoides | 29 |
| Figura 3. Rol central del WAT en el desarrollo de resistencia a la insulina sistémica y efectos protectores de una dieta suplementada con AGPI n-3..... | 36 |
| Figura 4. Reaccion de desaturación mediada por SCD1 | 39 |
| Figura 5 Fases en la separación de células mononucleares | 55 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Causas comunes de obesidad secundaria..... | 21 |
| Tabla 2. Consecuencias de salud de la obesidad de niños y adolescentes. Fuente: Wang Y. Child obesity and health. International Encyclopedia of Public Health, 2008: 590-604 . | 24 |
| Tabla 3. Mecanismos potenciales por los que los omega-3 disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular | 32 |
| Tabla 4 Características de la población al inicio y final del estudio. | 65 |
| Tabla 5. Comparación de los parámetros bioquímicos de la población al inicio y final del estudio. | 67 |
| Tabla 6. Clasificación por etapa puberal y género. Escala Tanner..... | 67 |
| Tabla 7. Características de la población por género (Masculino), | 68 |
| Tabla 8. Comparación de los parámetros bioquímicos en el género Masculino al inicio y final del estudio..... | 69 |
| Tabla 9. Características de la población por género (Femenino), | 69 |
| Tabla 10. Comparación de los parámetros bioquímicos en el género Femenino al inicio y final del estudio..... | 70 |
| Tabla 11. Expresión génica relativa en tejido adiposo subcutáneo. | 71 |
| Tabla 12. Expresión génica relativa en células sanguíneas mononucleares | 72 |
| Tabla 13. Expresión génica relativa en tejido adiposo, ajustada por género | 73 |
| Tabla 14. Expresión génica relativa en células mononucleares, ajustada por género..... | 74 |
| Tabla 15. Relación en la expresión génica de tejido adiposo y células sanguíneas mononucleares | 75 |

Índice de Gráficas

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Porcentaje de cambio al final de la intervención de las variables antropométricas con significancia estadística ($p < 0.05$). Población general. | 66 |
| Gráfica 2 Expresión génica relativa. Post-intervención. Tejido Adiposo Subcutáneo. n =18 | 71 |
| Gráfica 3 Expresión génica relativa. Post-intervención. Células sanguíneas mononucleares. n=11 | 72 |
| Gráfica 4 Expresión génica relativa en tejido adiposo, por género | 73 |
| Gráfica 5. Expresión génica en células mononucleares sanguíneas por género | 74 |
| Gráfica 6. Correlación de la expresión génica relativa de SCD1 y SCD5 en células sanguíneas mononucleares | 76 |
| Gráfica 7 Correlación de la expresión de Elovl5 y SCD5 en células mononucleares y tejido adiposo..... | 77 |
| Gráfica 8. Correlación en la expresión génica de SCD1 y Elovl5 en tejido adiposo | 77 |
| Gráfica 9. Correlación de la expresión génica de Elovl6 y SCD5 Tejido Adiposo..... | 78 |
| Gráfica 10. Correlación de la expresión génica de Elovl5 en células mononucleares con la circunferencia de cintura y cadera | 79 |

1. Resumen

La obesidad es una enfermedad multifactorial que está incrementándose en el mundo. Se asocia al desarrollo de enfermedades metabólicas en adultos y pacientes pediátricos. La utilización de ácidos grasos omega 3 es una alternativa para manejar las alteraciones metabólicas secundarias a la obesidad y modular algunas rutas enzimáticas lipogénicas, como las de desaturación y elongación. Enzimas como SCD1 y Elovl6 han sido implicadas en el desarrollo de la obesidad, mientras que Elovl5 y SCD5 se han relacionado con el metabolismo de lípidos alterado en obesidad. El objetivo del estudio fue correlacionar la diferencia de la expresión génica con las variables bioquímicas y antropométricas en una población de individuos obesos de 10 a 16 años tras la suplementación con 3000mg de ácidos grasos omega 3 durante 12 semanas. Se estudiaron 18 pacientes a los cuales previo consentimiento informado, se tomó biopsia de tejido adiposo subcutáneo y sangre periférica para la determinación de la expresión génica, glucosa en sangre y perfil de lípidos; se midieron las variables antropométricas peso, talla, IMC, circunferencia de cintura y cadera y porcentajes de masa magra y grasa. Se midió la expresión génica tras la extracción de RNA, retroconversión a cDNA y la amplificación con PCR-RT con sondas y oligonucleótidos específicos. Se encontró una diferencia significativa en la expresión de Elovl5 en tejido adiposo ($p=0.009$) y de SCD1 en células sanguíneas mononucleares ($p=0.004$). Los triglicéridos disminuyeron ($p=0.002$) sin cambio asociado en la expresión génica. La expresión de Elovl5 en tejido adiposo se asoció a la concentración de colesterol HDL ($r=0.802$, $p=0.017$), el cambio de colesterol total ($r=0.786$, $p=0.021$), y la expresión de Elovl5 en células mononucleares se asoció a la circunferencia de cintura ($r=-0.699$, $p=0.024$) y circunferencia de cadera ($r=-0.685$, $p=0.029$). Encontramos una regulación coordinada de SCD1 y SCD5 en células mononucleares. Hubo una tendencia al incremento del colesterol LDL ($p>0.05$) tal como lo reportado por otros Gunnarsdottir y colaboradores en 2004; es necesario evaluar cuidadosamente las concentraciones de LDL en pacientes que se sometan a suplementación con ácidos grasos omega 3. Finalmente encontramos que los ácidos grasos omega 3 disminuyen los triglicéridos en pacientes obesos de 10 a 16 años y que la regulación de Elovl5 en tejido adiposo se relaciona con el colesterol total y el colesterol HDL, lo cual coloca a la Elovl5 como un posible blanco terapéutico en el tratamiento de desórdenes lípidos:

Palabras clave: obesidad, ácidos grasos poliinsaturados omega 3, expresión génica, SCD1, SCD5, Elovl5, Elovl6.

2. Abstract

Obesity is a multifactorial disease with a rising incidence all over the world. It is associated with the development of metabolic diseases in adults and pediatric patients. The use of omega-3 fatty acids is an alternative for managing the metabolic alterations secondary to obesity and to modulate some lipogenic enzymatic pathways, such as desaturation and elongation. Enzymes as SCD1y Elov16 have been implicated in the development of obesity, while SCD5 and Elov15 have been associated with altered lipid metabolism in obesity. The aim of this study was to correlate the difference in gene expression with biochemical and anthropometric variables in a population of teenage (10 to 16 yrs. old) obese individuals after supplementation with 3000mg of omega 3 fatty acids for 12 weeks. We studied 18 patients with informed consent. A biopsy of subcutaneous adipose tissue was taken. We also obtained peripheral blood to determine gene expression, blood glucose and lipid profile. Additional data collected: Anthropometric variables (weight, height, BMI, waist circumference and hip percentages of lean and fat mass). Gene expression was determined after extraction of RNA, cDNA retroconversion and PCR-RT amplification and specific primers and fluorescent probes. There was a significant difference in the expression of Elov15 in adipose tissue ($p = 0.009$) and SCD1 in blood mononuclear cells ($p = 0.004$). Triglycerides decreased ($p = 0.002$) with no associated change in gene expression. Elov15 expression in adipose tissue was associated with HDL cholesterol ($r = 0.802$, $p = 0.017$), total cholesterol change ($r = 0.786$, $p = 0.021$), and Elov15 expression in mononuclear cells was associated to waist circumference ($r = -0.699$, $p = 0.024$) and hip circumference ($r = -0.685$, $p = 0.029$). We found a coordinated regulation of SCD1 and SCD5 in mononuclear cells. There was a trend toward increased LDL cholesterol ($p > 0.05$). As reported by other Gunnarsdottir et al in 2004, it is necessary to carefully assess the levels of LDL in patients undergoing supplementation with omega-3 fatty acids. Finally we found that omega-3 fatty acids reduce triglycerides in teenage obese patients and Elov15 regulation in adipose tissue is related to total cholesterol and HDL cholesterol, which puts the Elov15 as a potential therapeutic target in the treatment of lipid disorders.

Keywords: obesity, omega-3 polyunsaturated fatty acids, gene expression, SCD1, SCD5, Elov15, Elov16.

3. Introducción

La obesidad es una enfermedad multifactorial, caracterizada por el exceso de grasa corporal, producto de un desequilibrio en el balance energético, sucede cuando el consumo energético es mayor al gasto. La obesidad se asocia a un estado inflamatorio de baja intensidad¹, puede afectar a casi todos los órganos y tejidos del cuerpo, causando una multitud de problemas clínicos², además, la obesidad incrementa el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares (ECV), las dislipidemias, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), la hipertensión arterial (HTA) y diversos tipos de cáncer.³

La prevalencia de obesidad y sus comorbilidades está incrementándose en todo el mundo⁴. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el año 2008, cerca de 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres tenían obesidad, lo que representa el 10% de la población mundial. Adicionalmente, se sabe que el 44% de los casos de diabetes, 23% de los eventos de las enfermedades isquémicas del corazón y entre el 7 al 41% de los cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. Actualmente las enfermedades relacionadas al sobrepeso y obesidad constituyen la 5ta causa de muerte a nivel mundial⁵ y la 2da causa de muerte en países desarrollados³.

La obesidad pediátrica se diagnóstica habitualmente utilizando tablas percentilares del índice de masa corporal IMC (relación entre el peso y la talla al cuadrado) ajustado para la edad. Se considera a un niño obeso cuando se encuentra por arriba del percentil 95 del valor de referencia para su sexo y edad⁶.

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006) encontró que uno de cada tres hombres o mujeres adolescentes tiene sobrepeso u obesidad, esto representa alrededor de 5 757 400 adolescentes en el país.⁷ Esta cifra es alarmante debido a que la obesidad pediátrica tiene graves consecuencias para la salud de los niños y adolescentes los cuales tienen efecto a corto y largo plazo⁸. Por lo que, hoy en día, los pediatras atienden enfermedades crónicas asociadas a la obesidad anteriormente denominadas como enfermedades de la vida adulta.⁹

Presentar obesidad en la niñez o adolescencia crea un panorama distinto a desarrollar obesidad en la vida adulta. Los pacientes pediátricos obesos tienen una mayor probabilidad de presentar alteraciones clínicas a edades tempranas (baja autoestima, problemas de comportamiento, hipertensión arterial, dislipidemias, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, asma, apnea obstructiva del sueño e inflamación crónica), disminuyendo notablemente su calidad de vida. Lamentablemente los niños y adolescentes obesos tienen una alta probabilidad de continuar siendo obesos en su vida adulta, y se encontró que tener obesidad a los 18 años (desarrollada en la edad infantil) constituye un factor de riesgo independiente de muerte prematura⁸.

Los niños y adolescentes con obesidad presentan alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, debido al exceso en la acumulación de grasa corporal. Es frecuente encontrar la presencia en niños obesos de niveles altos de colesterol y triglicéridos, lo que favorece el desarrollo de enfermedad

aterosclerótica, siendo así las dislipidemias en la infancia uno de los principales factores de riesgo cardiovascular¹⁰.

Los niños y adolescentes obesos, están enfermos y deben ser tratados desde un enfoque multidisciplinario, para mejorar su condición de salud actual y evitar complicaciones futuras. En la actualidad, las medidas más socorridas para tratar la obesidad se centran en la adopción de un estilo de vida saludable, cambios en los hábitos de alimentación con mantenimiento a largo plazo¹¹. La Asociación Americana de Dietistas sugiere 4 estrategias iniciales para tratar la obesidad en los niños¹²:

- a) Reducir la ingesta de energía mientras se mantiene una óptima ingesta de nutrientes, esto para proteger el crecimiento y desarrollo.
- b) Incrementar el gasto de energía, a través de la realización de actividad física y desalentar las conductas sedentarias.
- c) Participar a los padres y personal de salud de primer contacto como agentes de cambio.
- d) Facilitar un ambiente familiar de apoyo

La utilización de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega 3 se ha sugerido como una alternativa para el manejo de las alteraciones metabólicas secundarias a la obesidad. Diversos estudios en humanos adultos han encontrado que un alto consumo de AGPI omega 3 se asocia a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, además provocan la disminución de los triglicéridos séricos¹³.

En modelos animales, los efectos del consumo de AGPI muestran un comportamiento similar y fueron pioneros en dilucidar las vías metabólicas reguladas por los AGPI omega 3 y cómo estos mejoran el metabolismo lipídico. La suplementación con omega 3 en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas evitó la resistencia a la insulina en el tejido muscular y hepático.¹⁴

Hasta ahora, se sabe que los AGPI omega 3 ejercen su acción regulando la expresión génica a través de la unión a ciertos factores transcripcionales como los receptores activados de peroxisomas (PPARs), la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP). En el hígado los AGPI y sus metabolitos pueden actuar como moduladores de factores de transcripción como el receptor hepático X (LXRs) y las proteínas de unión a esteroides (SREBPs) así como de otros factores de transcripción, que regulan una amplia variedad de genes.¹⁵ Además de intervenir en el estrés oxidativo y en la resistencia a la insulina.¹⁴

Además de los factores transcripcionales, los AGPI controlan y regulan la expresión de diversas enzimas estrechamente relacionadas con la biosíntesis de lípidos. Las enzimas de elongación (ELOVL) y de desaturación (SCD, Δ x) participan en la biosíntesis de AGPI omega 3, son reguladas directa e indirectamente por ellos, además ciertas enzimas de estas vías (esteroil CoA desaturasa 1, elongasa 5, elongasa 6) se han relacionado con la obesidad y alteraciones metabólicas del metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Existe evidencia de su la regulación de SCD1 por medio de AGPI omega 3. En un estudio Velliquete y cols encontraron que en humanos que los ácidos grasos

poliinsaturados alfa-linolénico (LNA), linoleico (LA) y eicosapentanoico (EPA) disminuyen el mRNA de SCD, y esta intervención nutricional puede ser útil en el manejo de niveles incrementados de triglicéridos en estados de riesgo cardiometabólico.¹⁶

Por lo anterior, parece que la disminución de la expresión de SCD1 por medio de diversas estrategias puede ser una alternativa de tratamiento en la obesidad, sin embargo debe tenerse cuidado ya que los medicamentos desarrollados para inhibir su expresión provocaron en los modelos expuestos resequedad ocular y pérdida de la barrera grasa de la piel. Otro inconveniente de la inhibición de SCD1 es que no se sabe si también podría afectarse la expresión de su isoforma SCD5 y si esto traería consecuencias al organismo.

SCD5 es una variante de SCD1 analoga a SCD2 en ratón, tiene como función biológica introducir una doble enlace en la posición delta 9 en el ácido palmítico y esteárico (misma función que SCD1). Fue descubierta en 1995 como una enzima que se encuentra principalmente en tejidos fetales y cerebrales, colocándola como una enzima propia del desarrollo. Sin embargo su expresión persiste en tejidos adultos sobretodo en cerebro y páncreas y se ha asociado a la maduración de preadipocitos a adipocitos en un modelo in vitro.

Por analogía con SCD1 y su acción en los cultivos de preadipocitos, SCD5 constituye un foco de interés en la investigación de moléculas que puedan ser reguladas por AGPI para el tratamiento de complicaciones asociadas a la obesidad.

Como se observó en los párrafos anteriores los AGPI son agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la obesidad y la regulación a través de ellos de las enzimas SCD1, SCD5, Elovl5 y Elovl6 puede dilucidar los mecanismos de estas sobre las alteraciones del metabolismo de lípidos. Es importante considerar que los estudios realizados son en su mayoría en modelos animales y adultos, así que la modulación de estas enzimas en niños y adolescentes obesos no ha sido suficientemente estudiada.

Por lo anterior se propone evaluar los efectos de la suplementación dietética de AGPI omega 3 en población pediátrica obesa, midiendo los cambios en la expresión génica de las enzimas SCD1, SCD5, Elovl5 y Elovl6.

4. Marco Teórico

4.1. Obesidad Pediátrica

Diagnóstico

Debido a que el Índice de Masa Corporal (IMC) cambia durante la niñez y adolescencia, los puntos de corte del IMC usados para definir el sobrepeso y la obesidad en niños y adultos no pueden ser aplicados directamente a la población pediátrica. Mediciones suplementarias de la adiposidad en los niños y adolescentes como pliegues cutáneos, porcentaje de peso ideal para la edad y desviación estándar del IMC específico para la población deben ser consideradas. Aunque estas mediciones reflejan levemente distintos aspectos de la composición corporal o el tamaño corporal, se correlacionan moderadamente con la grasa

corporal, incluso en niños en crecimiento. En países que cuentan con tablas específicas de IMC para género y edad, la obesidad se diagnóstica generalmente como un percentil mayor o igual a 95 de IMC para la edad, y el sobrepeso como un IMC entre 85 y 95 del mismo indicador.⁹

Clasificación de la obesidad

Aunque el exceso de grasa corporal suele llevar a las mismas alteraciones metabólicas en los mismos, no todos los niños obesos tienen una causa en común ni deben ser tratados de la misma manera. La obesidad se clasifica de acuerdo a su origen en endógena (producto de alteraciones endocrinas y genéticas) y exógena (derivada de factores medioambientales)¹⁷.

La obesidad endógena se presenta en etapas tempranas de la vida, ocurre frecuentemente en asociación con otros trastornos endocrinos y genéticos, los signos y síntomas de éstos incluyen hipogonadismo, talla baja, trastornos dismórficos y retardo mental. El retraso en el crecimiento caracteriza a la obesidad endógena secundaria a desórdenes endocrinos como el hipotiroidismo e hipercortisolismo. Los niños con obesidad secundaria a síndromes genéticos típicamente tienen características físicas encontradas tras la exploración clínica. Estas características incluyen una talla menor a la esperada para su edad y una edad ósea normal o retrasada¹⁷.

Debe realizarse una cuidadosa historia clínica y examen físico para descartar o sospechar una causa endógena o de obesidad en la mayoría de los niños¹⁷

En la tabla 2 se enlistan las causas más comunes de obesidad secundaria (producto de algún síndrome genético, mutación, medicamento o condición no intrínseca), se identifican también las causas de obesidad endógena.

| Tabla 1. Causas comunes de obesidad secundaria. |
|--|
| <p>Genéticas*</p> <p>Enfermedades monogénicas*</p> <p>Mutación del receptor 4 de melanocortina*</p> <p>Deficiencia de leptina*</p> <p>Deficiencia de proopiomelanocortina*</p> <p>Síndromes*</p> <p>Prader-Willi*</p> <p>Bardet-Biedl*</p> <p>Cohen*</p> <p>Alstrom*</p> <p>Fröhlich*</p> <p>Neurológicas</p> <p>Daño cerebral*</p> <p>Tumor cerebral*</p> <p>Consecuencias de irradiación craneal*</p> <p>Obesidad hipotalámica*</p> <p>Endócrinas</p> <p>Hipotiroidismo*</p> <p>Síndrome de Cushing*</p> <p>Deficiencia de hormona del crecimiento*</p> <p>Pseudohipoparatiroidismo*</p> <p>Psicológicas</p> <p>Depresión</p> <p>Trastornos de alimentación (trastorno por atracón, comedores nocturnos)</p> <p>Inducido por fármacos</p> <p>Antidepresivos tricíclicos</p> <p>Anticonceptivos orales</p> <p>Antipsicóticos</p> <p>Anticonvulsivos (valproato de sodio, carbamazepina)</p> <p>Sulfonilureas</p> <p>Glucocorticoides</p> |
| <p>* Causa de obesidad endógena</p> <p>Fuente: Singhal V, Schwenk F, Kumar S. Evaluation and management of childhood and adolescent obesity. Mayo Clin Proc. 2007;82(10):1258-1264</p> |

La obesidad exógena, causada principalmente por factores medioambientales inherentes al estilo de vida (dieta hiper-energética, sedentarismo, alto consumo de grasas y azúcares). Los niños con obesidad exógena son generalmente altos y

suelen presentar una aceleración del crecimiento a la par de un adelanto en su edad ósea.¹⁷

Evaluación clínica de niños y adolescentes con obesidad

La evaluación pediátrica inicia con una valoración del niño dentro de su contexto familiar y escolar.

Los objetivos de la evaluación son:

- Cuantificar el exceso de peso
- Calcular la tasa de incremento de peso y estatura (velocidad de crecimiento).
- Identificar otros factores de riesgo para la persistencia de la obesidad (obesidad en los padres, condiciones de salud que limiten la actividad física, inseguridad alimentaria, problemas mentales).
- Descartar causas de obesidad endógena o secundaria.
- Identificar las comorbilidades existentes.
- Identificar aspectos familiares o sociales que puedan intervenir con el tratamiento.

Evaluación de Laboratorio

Se evalúa en el paciente el perfil de lípidos en ayuno (concentraciones de lipoproteínas de baja densidad LDL, lipoproteínas de alta densidad HDL, concentración de triglicéridos y colesterol total). Este estudio se recomienda principalmente en los niños con exceso de peso y una familia con historia de hiperlipidemia o enfermedad cardiovascular temprana, así como diabetes tipo 2.

Ha sido recomendado por la Asociación Americana del Corazón que el nivel de colesterol total en los niños sea menor de 170 mg/dL (4.40 mmol/L) y el de LDL menor de 110 mg/dL (2.84 mmol/L).

También debe evaluarse la concentración de glucosa plasmática en ayuno, ya que esto es el test estándar para diagnosticar diabetes tipo 2 (los niños obesos están en riesgo de desarrollarla). Una glucosa mayor de 126 mg/dL lleva al diagnóstico de diabetes, entre 110 y 126 mg es un estado de prediabetes¹⁸.

Tratamiento de la obesidad pediátrica (exógena)

Las recomendaciones dietéticas hechas por la mayoría de los pediatras y otros profesionales de la salud para el manejo de la obesidad infantil, es una moderada restricción de energía, utilizando las recomendaciones del Departamento de Agricultura y la pirámide de alimentos, además de las guías dietéticas de la Asociación Americana del Corazón para desarrollar un plan nutricional balanceado, con porciones de tamaño controlado, apropiado para la edad. La efectividad del plan es mejor si se acompaña de la reducción en la ingesta de alimentos ricos en grasa y azúcares simples, además de los refrescos; y se da énfasis al consumo de comidas bajas en calorías, alimentos altos en fibra como frutas, vegetales y granos enteros¹².

Otra medida esencial en el tratamiento de la obesidad es el incremento del nivel de actividad física para incrementar el gasto energético. Las guías más recientes recomiendan que en niños y adolescentes se realicen de 30 a 60 minutos de actividad física apropiada para la edad la mayoría de los días de la semana¹².

Comorbilidades en la obesidad pediátrica

Se ha reportado que la obesidad en niños y adolescentes trae consigo consecuencias en la salud a corto, mediano y largo plazo; además tiene un efecto en la morbilidad y mortalidad en la edad adulta¹⁹. En la tabla 2 se enlistan algunas de las enfermedades relacionadas y la etapa aproximada de presentación en los niños obesos.

| Presentación/Sistema | Condición/Enfermedad |
|--|---|
| Consecuencias inmediatas e intermedias | |
| Cardiovasculares | Hipertensión, dislipidemia |
| Endocrinológicas | Resistencia a la insulina/alteraciones en la tolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2, anormalidades menstruales, síndrome de ovario poliquístico. |
| Gastrointestinales | Colelitiasis, esteatosis hepática, reflujo gastroesofágico |
| Neurológicas | Hipertensión intracraneal idiopática |
| Ortopédicas | Desplazamiento de las epífisis, enfermedad de Blount (tibia vara), pie plano, esguinces del tobillo |
| Pulmonares | Asma, desórdenes del sueño, síndrome de Pickwickian |
| Consecuencias a largo plazo | |
| Persistencia de la enfermedad | Los niños obesos tienen la probabilidad de continuar siendo obesos en la adultez |
| Morbilidad | Enfermedad coronaria, diabetes, aterosclerosis, fractura de cadera, algunos tipos de cáncer |
| Mortalidad | Por todas las causas, enfermedad específica secundaria a enfermedad (ejemplo ECV) |

Tabla 2. Consecuencias de salud de la obesidad de niños y adolescentes. Fuente: Wang Y. Child obesity and health. International Encyclopedia of Public Health, 2008: 590-604

La obesidad en niños y adolescentes se ha asociado con graves comorbilidades incluyendo diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y dislipidemias. Los triglicéridos séricos se encuentran frecuentemente elevados en la obesidad y son considerados un signo temprano de síndrome metabólico.

4.2. Tejido Adiposo

La mayor parte de la masa grasa del cuerpo suele acumularse en el tejido adiposo y es por tanto, el principal tejido implicado en el desarrollo de la obesidad. El tejido adiposo consiste en adipocitos embebidos en una matriz de tejido conectivo que contiene fibroblastos, preadipocitos, macrófagos y tejido vascular²⁰.

El tejido adiposo es un órgano que forma parte del sistema endócrino, está compuesto por tejido adiposo blanco (WAT) y tejido adiposo pardo (BAT). El WAT sirve principalmente como depósito de energía y triglicéridos, mientras que el BAT almacena pequeñas cantidades de grasa, las cuales se oxidan para producir calor y regular la temperatura corporal²¹.

El BAT genera calor a través de la acción desacoplante de la proteína UCP1, es un tejido rico en mitocondrias con una elevada tasa metabólica. Se sabe que todos los neonatos nacen con cantidades considerables de BAT el cual puede persistir en cantidades residuales en la edad adulta²¹. En los adultos se encuentran remanentes de BAT en el mediastino, espacio paravertebral y cuello²².

El principal rol del WAT es el almacenamiento de triglicéridos durante el consumo de energía y liberar los ácidos grasos cuando el gasto de energía excede la ingesta.

El WAT se encuentra en el tejido subcutáneo, a nivel intra-abdominal, en el epicardio, tejido extramiocelular, perivascular, linfoidal, retroorbital y facial. También está presente en la médula ósea y las glándulas mamarias²².

En los humanos, la masa de tejido adiposo blanco cambia dramáticamente. De hecho, ningún otro tejido puede variar en cantidad como lo hace el tejido adiposo,

lo que determina la delicada regulación del equilibrio entre el depósito de grasa y su utilización. Un crecimiento excesivo de la masa de tejido adiposo ocurre en la obesidad²².

Aunque el WAT ha sido considerado como metabólicamente inactivo, hoy se sabe que controla el metabolismo energético. Su regulación se da a través de mecanismos endocrinos, paracrinos y señales autocrinas que permiten al adipocito regular el metabolismo de otras células localizadas en el cerebro, hígado, músculo y páncreas.

Las funciones del WAT pueden clasificarse en tres rubros ²³:

- a) Metabolismo de lípidos
- b) Catálisis de triglicéridos
- c) Secretar adipocinas, citocinas y hormonas.

Las citocinas secretadas por el WAT en la obesidad pueden regular el gasto energético, aunque la mayor parte promueven un proceso que resulta en una inflamación sistémica crónica. De acuerdo a su distribución corporal, el WAT a nivel abdominal (obesidad abdominal) medido por medio de la circunferencia de cintura, es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de resistencia a la insulina y ECV. El WAT visceral (abdominal) secreta más citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) así como reactantes de fase aguda (Proteína C reactiva) que el WAT subcutáneo²⁰.

4.3. Ácidos Grasos Poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son ácidos grasos de 18 carbonos o más que contienen 2 o más dobles enlaces en posición cis interrumpidos por un grupo metileno.²⁴ Los AGPI son componentes importantes de la dieta, involucrados en un número de diversos procesos fisiológicos. Además de su rol como componentes estructurales de los lípidos celulares, los AGPI también sirven como sustratos para la síntesis de varios mediadores fisiológicos como el ácido araquidónico y los eicosanoides (moléculas bioactivas mediadoras de la inflamación, la respuesta inmune y procesos del sistema nervioso central)²⁵. Los AGPI claves en el metabolismo humano son el ácido linoleico (LNA, 18:2 n-6) y el ácido linolénico (ALA, 18:3, n-3) los cuales no pueden ser sintetizados por las células humanas debido a que los humanos carecen de la $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas necesarias para introducir un doble enlace en la posición n-3 (omega 3) o n-6 (omega 6) en la cadena carbonada de un ácido graso²⁶. Estos AGPI necesitan ser obtenidos de la dieta y se les ha denominado ácidos grasos esenciales.

Existen dos formas principales de AGPI: la serie n-6 y n-3. La clasificación se refiere a la posición del primer doble enlace respecto al carbono metílico.²⁵ (Figura 1). Los ácidos grasos eicosapentanoico (EPA, C20:5), docosahexanoico (DHA, C22:6) y araquidónico (AA, C20:4) son condicionalmente esenciales, ya que pueden obtenerse por medio de un proceso de elongación y desaturación endógena.

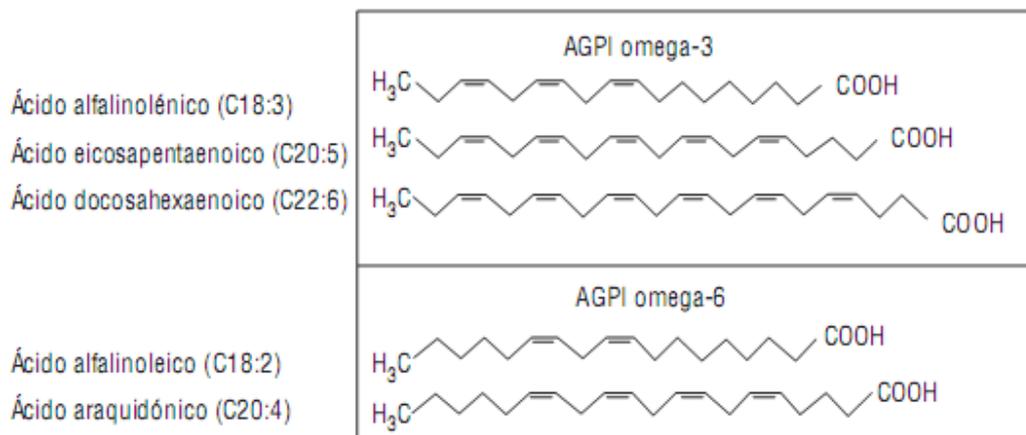


Figura 1 Principales Ácidos Grasos Poliinsaturados n-3 y n-6.

Fuente: Caballero R, Gómez R, Nuñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. Rev Esp Cardiol. 2006;6(Suppl):3D-19D

La nomenclatura utilizada para designar a los AGPI en la presente revisión (Figura 1) indica: número de carbonos designada por la letra C, y el número de dobles enlaces indicado por los dos puntos (:), también se especifica la serie con la indicación n-3, n-6 u omega-3, omega-6. Existen diversas formas para designar los nombres de los AGPI los cuales no se explicaran en este documento.

El principal ácido graso n-6 proveniente de la dieta es el LNA el cual se encuentra en altas concentraciones en granos, semillas y carnes, así como en los aceites vegetales de maíz, girasol, cártamo, canola y soya. El principal ácido graso n-3 derivado de la dieta es el ALA el cual se encuentra en semillas de lino, vegetales de hoja verde, chia y nueces. El ácido LNA sirve como un sustrato importante en la síntesis de otros AGPIs n-3 como el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 n-3)²⁶. El EPA es un importante componente de los lípidos celulares de las células nerviosas y es un precursor de la síntesis de

la serie PG3 de prostaglandinas.²⁵ Por su parte, el DHA juega un papel importante en el desarrollo cerebral fetal, el desarrollo óptimo de las habilidades motoras y la agudeza visual en niños, el metabolismo de lípidos en niños y adultos así como el apoyo cognitivo en los ancianos.²⁷

Tras ser consumidos o sintetizados de novo, los AGPI de las series omega 6 (LNA, AA) y omega 3 (ALA, EPA, DHA) dan origen a diversas moléculas biofuncionales. (figura 2). En los humanos, la conversión de ALA a EPA sucede lentamente, aproximadamente el 5% es convertido a EPA y de este porcentaje, del 2-5% des convertido en DHA²⁸. Posteriormente son incorporados en triglicéridos, fosfolípidos y estéres de colesterol.²⁶

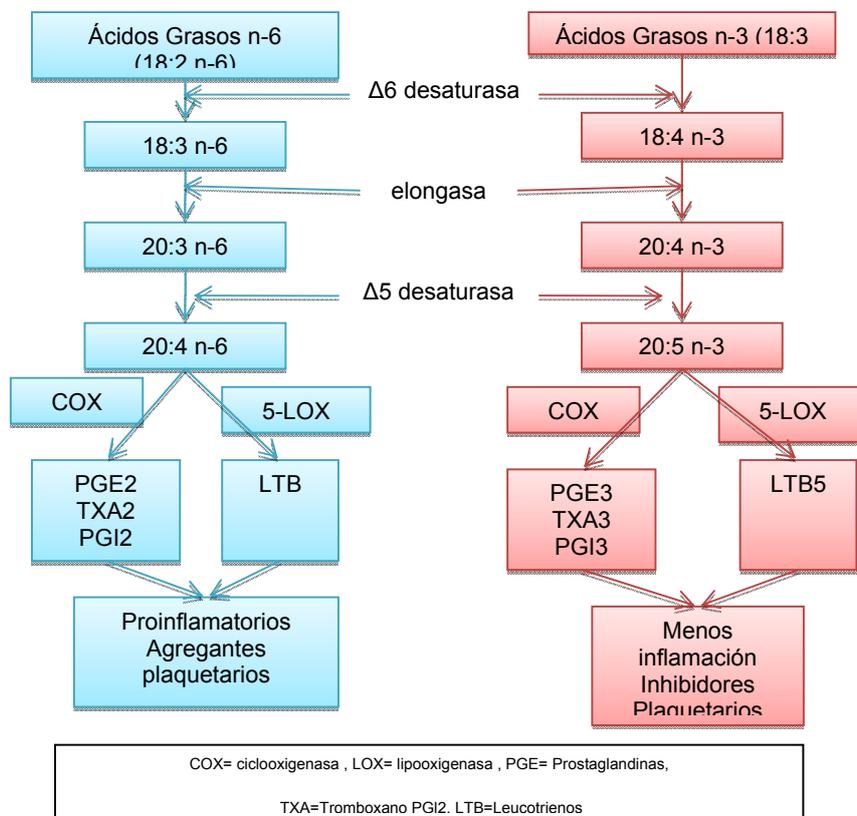


Figura 2 Metabolismo de los AGPI n-3 y síntesis de eicosanoides

Fuente: modificado de: Allayee H, Roth N, Hadis HN. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease. Implications for nutrigenetics. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2009;2:140-148

Los ácidos grasos poliinsaturados representan el componente fundamental de los fosfolípidos de la membrana celular. Los AGPI se localizan usualmente en la posición 2, mientras que los ácidos grasos saturados o monoinsaturados son usualmente encontrados en la posición 1 o 3 de las moléculas de fosfolípidos.²⁹

La biosíntesis endógena de EPA y DHA a partir del ácido linolénico no es la única fuente de estos para el organismo; los ácidos grasos EPA y DHA pueden obtenerse directamente de la dieta de fuentes tales como: pescado azul (túnidos, salmónidos)³⁰ y aceite de pescado. Las especies más ricas en AGPI n-3 (EPA/DHA) por cada 100 gramos de pescado crudo son: sardina 3.3 gr, macarela 2.5 gr, arenque 1.7 gr, anchoas 1.4 gr, salmón 1.4 gr y sable 1.4 gr.³¹

Como se revisó anteriormente, la síntesis de los ácidos grasos AA, EPA y DHA comparte enzimas comunes de la ruta de elongación y desaturación de ácidos grasos. Es importante saber que sólo un pequeño porcentaje del LA y ALA son convertidos a sus ácidos grasos de cadena muy larga (AA, EPA, DHA), ya que una gran parte es directamente llevado utilizado en la vía de la β -oxidación. En promedio del 60-85% de ALA y del 50% del LA son utilizados casi de inmediato. El destino de estos ácidos grasos es en su mayoría la producción de energía en tejidos como el corazón y el músculo, o de lo contrario, se recicla su cadena carbonada para ser usada en la producción de otros ácidos grasos, aminoácidos y esteroides en el cerebro y el hígado.³²

En los tejidos lipogénicos, ALA es convertido a EPA y DHA a través de una cadena de pasos de elongación y desaturación. Primero el ALA es desaturado a

18:4n-3 por la $\Delta 6$ desaturasa, posteriormente es elongado a 20:4n-3, y después es convertido a EPA por la $\Delta 5$ desaturasa, el EPA puede ser elongado por la elongasa 2 para formar 22:5n-3 y después a 24:5n-3 seguido de una $\Delta 6$ desaturación para formar 24:6n-3. Todas estas reacciones ocurren en el retículo endoplásmico (RE). Sin embargo para la biosíntesis de DHA es necesaria la participación de los peroxisomas, donde a través de una β -oxidación el AG 24:6n-3 y así formar 22:6n-3.³² La síntesis de los AGPI n-3 y n-6 se desglosa gráficamente en la figura 2.

4.3.1. Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega 3.

Reservorios corporales de AGPI n-3

Al igual que otros AGPI, los omega 3 se almacenan en el tejido adiposo blanco WAT, El tejido adiposo contiene pequeñas cantidades de AGPI n-3; el principal de ellos es el ALA que se encuentra en cantidades del 1% y el DHA y EPA se encuentran aún en cantidades menores, lo que sugiere una limitada capacidad de almacenaje de estos ácidos por lo cual deben ser aportados paulatinamente por la dieta.³³

Existen sitios específicos de depósito de los AGPI n-3, un ejemplo es el DHA que constituye casi el 17% del total de los ácidos grasos en el cerebro.²⁹ Otros tejidos tienen un menor porcentaje de AGPI n-3, se ha descrito en población norteamericana sana que el DHA constituye aproximadamente el 4% del total de los lípidos en los glóbulos rojos y de 2.5 a 3.4% del contenido de los fosfolípidos séricos.³³

Se ha reportado que el consumo de AGPI omega 3 incrementa los niveles de estos ácidos grasos en los tejidos corporales. Los estudios Anderson, Harris y Breslow (revisados por Arterburn en 2006) en humanos mostraron que, la suplementación con DHA durante 3 a 6 meses, provocó el incremento de los niveles de DHA y EPA en el miocardio, músculo esquelético, tejido adiposo y epitelio rectal.³³

Efectos metabólicos de los AGPI n-3

Es bien sabido que los AGPI n-3 confieren beneficios a la salud cardiovascular principalmente por el enriquecimiento de los fosfolípidos de membrana con EPA y DHA, a través de este mecanismo, reducen la presión arterial, mejoran la función arterial y endotelial, reducen la agregación plaquetaria y afectan favorablemente el tono autonómico (tabla 3).²⁹

Tabla 3. Mecanismos potenciales por los que los omega-3 disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular³⁴

Reduce la susceptibilidad de arritmia ventricular
Antitrombogénicos
Hipotrigliceridemiante (en ayuno y posprandial)
Retarda el crecimiento de la placa de ateroma
Reduce la expresión de moléculas de adhesión
Reduce el factor derivado de plaquetas
Antiinflamatorios
Promueven la relajación mediada por óxido nítrico endotelial
Leve efecto hipotensor

Fuente: Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:2747-2757

Hipertrigliceridemia

La hipertrigliceridemia es una condición clínica caracterizada por la elevación de los triglicéridos séricos por encima del punto de corte de la normalidad (150 mg/dL en adultos, 100 mg/dL en niños pequeños), es una condición asintomática que se presenta muchas veces asociada a obesidad y es un factor de riesgo para presentar enfermedades cardiovasculares.

Tanto el EPA como el DHA son potentes agentes que disminuyen los triglicéridos séricos.³⁵ Su efecto ha sido bien establecido en humanos. En 1997, Harris³⁶ reportó que una dosis de 4 gramos por día en promedio de AGPI n-3 provenientes de aceite de pescado, disminuyó la concentración de triglicéridos entre 25 a 30% acompañado con un incremento de LDL de 5 a 10% y un incremento del colesterol HDL de 1 a 3%.³⁴

El mecanismo de la baja de triglicéridos, consiste en la disminución de la producción de VLDL por hígado, esto se da por los siguientes mecanismos:

- a. La limitación de la disponibilidad de los ácidos grasos libres liberados de las reservas adiposas
- b. La supresión de los genes lipogénicos y la inducción de genes envueltos en la oxidación de ácidos grasos. En respuesta a la inhibición de γ PPAR y SREBP1
- c. La producción neta de la apolipoproteína B (Apo B, constituyente de las VLDL) está reducida
- d. Incremento de lipoprotein lipasa (LPL) en tejidos extrahepáticos.³⁷

Inflamación

La inflamación es un fenómeno que ocurre en una gran variedad de patologías, entre ellas cabe resaltar las enfermedades cardiovasculares y la obesidad, en la cual el fenómeno no está mediado por la agresión de un agente patógeno, sino más bien por componentes propios de la dieta y del metabolismo del cuerpo que inician una respuesta inmune de baja intensidad.

La inflamación de la pared vascular es un factor clave en el proceso dinámico de la aterosclerosis. Los AGPI n-3 poseen la habilidad de responder a la inflamación en la aterogenesis a través de mecanismos directos e indirectos. De forma directa disminuyen la inflamación debido a su rápido efecto sobre la regulación de los factores de transcripción y de forma indirecta regulando la producción de eicosanoides de la serie 3 y 5, así como los mediadores lipídico anti-inflamatorios y la supresión de reactantes de fase aguda.²⁶

Regulación de la expresión génica

Los AGPI n-3 son reguladores importantes de muchos genes críticos para el control de la homeostasis lipídica. Se ha reportado que los AGPI son ligandos de los PPARs con lo cual se inducen respuestas fisiológicas como la β -oxidación y adipogenesis. También los AGPI inhiben la conversión de SREBP a su forma activa, así ejercen una acción potencial sobre la transcripción de una variedad de genes involucrados en la síntesis de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos.³⁸

La acción de los AGPI no es solamente sobre los genes del metabolismo de lípidos. La modulación de NF- κ B es un denominador común en los efectos anti-inflamatorios y anti-aterogénicos de los AGPI n-3.³⁹

Adipogénesis regulada por AGPI

La masa de tejido adiposo puede incrementarse por hipertrofia o por hiperplasia (adipogénesis) de las células grasas. El consumo de AGPI promueve la disminución de la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, además disminuye la inflamación existente en la obesidad a través de la inmunomodulación de los macrófagos y una menor secreción de citosinas proinflamatorias; todo ello disminuye la resistencia a la insulina periférica, con lo que se evita el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad (figura 5)²⁹

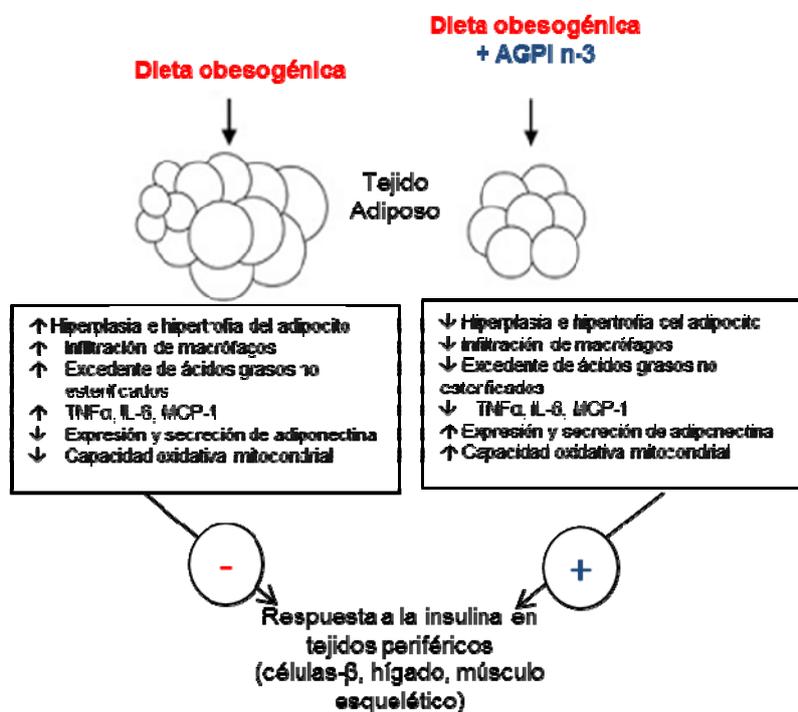


Figura 3. Rol central del WAT en el desarrollo de resistencia a la insulina sistémica y efectos protectores de una dieta suplementada con AGPI n-3.

Fuente: Flachs P, Rossmeisi M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-e polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clinical Science*. 2009;116:1-16

Farmacocinética y Farmacodinamia

Por vía oral, los AGPI n-3 se absorben en el duodeno, y su biodisponibilidad varía dependiendo de la formulación y de los cocientes omega-6/omega-3. Tras su absorción, los AGPI n-3 pueden:

- a) Ser transportados al hígado, donde se forman parte estructural de diferentes tipos de lipoproteínas que posteriormente son incorporadas al tejido adiposo.
- b) Acumularse en los fosfolípidos de la membrana celular para actuar como precursores para diversos eicosanoides.
- c) Oxidarse para la producción de energía utilizada por la célula.⁴⁰

Los principales efectos secundarios son de orden gastrointestinal (náuseas, dispepsia, molestias abdominales, gastritis y diarrea)⁴⁰ y ocurren habitualmente en dosis altas (>4g/día).

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de los AGPI omega-3 depende de su forma estructural en los lípidos de la dieta (triglicéridos, ésteres etílicos o fosfolípidos). Cuando los AGPI son consumidos en forma de triglicéridos se absorben eficientemente en el intestino (>95% de absorción). Los ésteres etílicos pueden ser una forma eficiente

de administración, y los fosfolípidos parecen incrementar los niveles de AGPI omega 3 directamente en el cerebro.²⁹

Dosis recomendada

La presentación farmacéutica de ácidos grasos omega 3 (esteres etílicos) debe consumirse siempre bajo prescripción médica y está recomendada para adultos con enfermedad cardiovascular preexistente o hipertrigliceridemia (triglicéridos >200mg/dL), la dosis es de 3 a 4 gramos por día; con esto los triglicéridos disminuyen entre 30 a 50% y hasta 45% si el paciente presenta niveles de triglicéridos muy altos (>500 mg/dL).⁴¹

Las recomendaciones existentes sobre el consumo de AGPI omega-3 en forma de triglicéridos y fosfolípidos, tanto en suplementos alimenticios, aceite de pescado, aceites vegetales (canola, linaza, lino; ricos en ALA) o alimentos ricos en omega 3, se mencionan a continuación.

La recomendación de la Asociación Norteamericana del Corazón (AHA) para EPA y DHA es de 1 gramo por día para pacientes con enfermedad coronaria establecida y de 2 a 4 gramos pacientes con hipertrigliceridemia ⁴² Las recomendaciones de la Academia Nacional de Ciencias establecen que el consumo de ácidos grasos omega 3 (ALA) para niños sanos de 4 a 18 años debe oscilar entre el 0.6 al 1.2% del valor calórico total (1.0 a 1.2 gramos por día).⁴³ La recomendación para población pediátrica con obesidad y un riesgo moderado de enfermedades cardiovasculares debe ser cuidadosamente realizada, ya que varias especies marinas fuente de omega 3 contienen altos niveles de

metilmercurio y otros contaminantes ambientales, de modo que el principal objetivo en la población pediátrica es prevenir la ingesta de dichos contaminantes sobre el alto consumo de DHA y EPA⁴².

No se cuenta con estudios clínicos en niños con hipertrigliceridemia para establecer una dosis de AGPI. Un consumo inferior a 4 gramos por día es seguro y permite observar cambios metabólicos en poblaciones similares.

Enzimas selectas participantes en el metabolismo de lípidos en la obesidad que pueden ser blancos de los AGPI omega 3

Esteroil CoA Desaturasa 1 (SCD1)

La esteroil CoA desaturasa es una enzima del RE que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados, los cuales son previamente sintetizados de novo o derivados de la dieta. Introduce un doble enlace en la posición 9 a partir del carbono carboxílico. SCD1 en unión con NADH, la flavoproteína citocromo 5 reductasa y el citocromo aceptor de electrones b5 en presencia de oxígeno molecular introducen una señal de doble enlace en el espectro de los sustratos ácidos grasos-metil-interrumpidos (Figura 4). Sus sustratos predilectos son palmitoil y esteroil-coA los cuales son convertidos a ácido graso palmitoleico y esteárico respectivamente. Esos productos son los ácidos grasos más abundantes en varias clases de lípidos como son: fosfolípidos, triglicéridos, colesterol, ésteres, ceras y diacilgliceroles. Además de los componentes de los lípidos los ácidos grasos monoinsaturados sirven como mediadores de la transducción de señales y la diferenciación celular.⁴⁴

Desaturation of Stearoyl-CoA by SCD

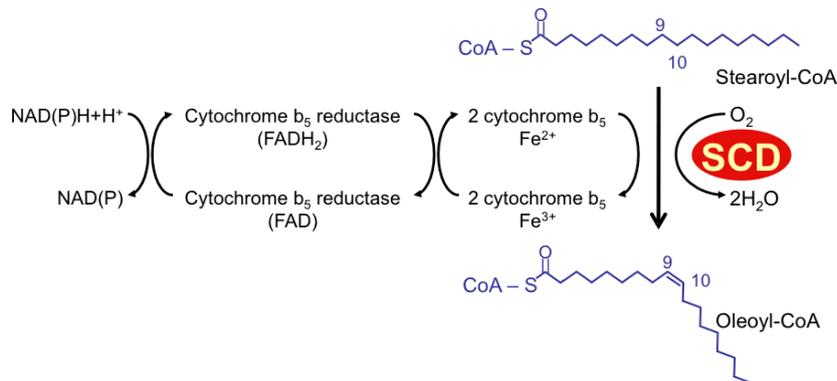


Figura 4. Reaccion de desaturación mediada por SCD1

Fuente: <http://www.biochem.wisc.edu/faculty/ntambi/default.aspx>

Se sabe que SCD1 es expresada en diversos tejidos, el principal es el tejido adiposo⁴⁵ y en el hígado. Su promotor ha sido clonado y caracterizado; contiene sitios de unión para SREBP, NF-Y y el elemento de respuesta a ácidos grasos poliinsaturados.⁴⁶ SCD1 tiene una región altamente conservada hacia la región UTR 3' entre ratones, ratas, ganado, cerdos y humanos, éste puede tener un papel clave en el ensamblaje de la transcripción, la poliadenilización y la salida del núcleo, así como en la regulación al nivel de los transcriptos y su estabilidad.⁴⁷ SCD1 es regulada tanto por el factor transcripcional PPAR α (regulador de genes lipolíticos) así como SREBP1c (regulador de genes lipogénicos) aunque estos tienen acciones opuestas.⁴⁵

Varios estudios estiman la actividad de SCD1 por medio de la medición de la expresión de mRNA de SCD1 aislado del índice de desaturación o la actividad enzimática directa. En base a lo demostrado por Lochsen y cols, quienes

encontraron que la actividad hepática de SCD en ratas está directamente relacionada con el nivel del mRNA de la misma.⁴⁸

Por otro lado, SCD es requerida a su vez para la síntesis hepática de esteres de colesterol, y es inducida por el colesterol de la dieta. Algunos estudios sugieren que juega un papel vital en el metabolismo de colesterol al proveer un sustrato para los esteres de colesterol para temporalmente almacenar el excedente en el hígado.⁴⁵ Además de la respuesta al colesterol, SCD responde al proceso de ayuno-realimentación, incrementando su expresión y actividad en hígado murino hasta 40 veces tras la administración de una dieta rica en carbohidratos.⁴⁹

La disminución en la expresión de SCD1 en estados hiperinsulinémicos puede lograrse tras la administración de AGPI n-3 los cuales impactan en primer lugar sobre SREBP1c a través de la disminución de la capacidad de transactivación de LXR α .⁵⁰

Estudios hechos en ratones comprobaron que la disminución de la expresión de SCD1 puede protegerlos contra la obesidad, a la vez de atenuar la resistencia a la insulina, sin embargo en humanos la evidencia es menos convincente. Los niveles de mRNA de SCD1 están negativamente asociados con enfermedades relacionadas al síndrome metabólico como la resistencia a la insulina.⁵¹ Incluso algunos estudios no han encontrado asociación entre SCD1 y obesidad en tejido adiposo humano.⁵² De manera opuesta se ha encontrado que la inducción de SCD1 puede atenuar la citotoxicidad mediada por palmitato y reducir la apoptosis

y la expresión de citocinas inflamatorias, constituyendo un mecanismo protector contra la lipotoxicidad.⁵³

SCD5

En humanos adicionalmente a la enzima SCD1 se ha encontrado una variación de la misma: SCD5 la cual es una $\Delta 9$ desaturasa, única en primates. Se expresa principalmente en tejido cerebral y en páncreas, tanto adulto como fetal, siendo mayoritariamente expresada en éste último, por lo cual se ha propuesto que SCD5 puede tener influencia en el desarrollo cerebral.⁵⁴

Para valorar la madurez del metabolismo lipídico de los oocitos, Feuerstein y colaboradores evaluaron la expresión de SCD5 en oocitos humanos maduros e inmaduros, esto realizado de manera similar a lo reportado por Moreau y cols que encontraron que las células en cumulo en ovarios de ratas expresaban SCD para proveer al oocito de ácidos grasos insaturados. Feuerstein encontró que los oocitos en fase de meiosis expresaban mayormente SCD5 que los oocitos inmaduros o maduros, siendo la primera vez que esto es reportado en tales células humanas.⁵⁵ Por lo tanto, la expresión de SCD5 es por tanto diferencial a la de SCD1, expresándose persistentemente SCD5 en cerebro y páncreas en humanos, así como isoformas similares en rumiantes.⁵⁶

Elongasa 5

La elongasa 5 (elovl5) es una enzima encontrada en humanos, participa en la elongación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Se ha encontrado

que se expresa de manera importante en testículos y glándulas adrenales, aunque puede ser encontrada en muchos tejidos humanos. Su gen codificante se encuentra en el cromosoma 6 (6p21.1-p12.1), se compone de 900 nucleótidos, los cuales son traducidos a 299 aminoácidos, formándose una proteína anclada al retículo endoplásmico.

En ratones, la enzima *elovl5* está relacionada en la elongación de los ácidos grasos de 18 carbonos a 20 carbonos. Se ha observado que es un blanco directo de SREBP1c y se controla a través de la activación del complejo transcripcional LXR α -SREBP1c. El mecanismo de retroalimentación es mediada por la acción de los AGPI sobre SREBP1c.¹⁵

La expresión de *Elovl5* (así como las desaturasas $\Delta 5$ y 6) fueron significativamente inhibidas por la administración de ácidos grasos omega 6 y omega 3 en hepatocitos de ratón probablemente reflejando un mecanismo de retroalimentación negativa por la biosíntesis de AGPI.¹⁵ Ratones knock-out para *Elovl5* mostraron que la reducción en la actividad de esta enzima disminuyó los productos AGPI C20-22, lo cual produjo un incremento en la activación de SREBP-1c así como los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.⁵⁷ La disminución puede ser atribuida a la retroalimentación negativa de los AGPI sobre la acción de *Elovl5*, ya que otros autores han encontrado que la relación entre la expresión de *Elovl5* en hígado de ratas y el contenido nuclear y la expresión de SREBP1c es independiente; sin embargo, existe una relación directa entre la regulación de *Elovl5* y PPAR α .⁵⁸

Elovl6

La enzima microsomal elovl6 proviene de una familia de enzimas altamente conservadas, cuya función es elongar ácidos grasos de 16 carbonos a 18 carbonos. Se expresa prácticamente en todos los tejidos, aunque se encuentra mayoritariamente en aquellos con alto contenido lipídico como el WAT, BAT, hígado y cerebro.

En ratas elovl6 se regula por el factor de transcripción SREBP-1 así como por PPAR α , además del heterodímero formado por la proteína de unión al elemento regulador de carbohidratos (ChREBP) y el factor X parecido a Max (MaX-like factor X). La supresión de elovl6 en ratas diabéticas y en ratones intolerantes a la glucosa que consumían una dieta alta en grasa se correlacionó con niveles nucleares más bajos de SREBP1.⁵⁹ También se ha encontrado que en ratones knockout para el gen elovl6 estos están protegidos contra la resistencia a la insulina mediada por dieta aunque existe obesidad y baja oxidación de ácidos grasos en el hígado, contrario al mecanismo fisiológico habitual. Lo cual no puede explicarse por cambios en el balance de energía o las señales proinflamatorias.⁶⁰

En modelos animales (ratas y ratones) se ha encontrado que las elongasas 5 y 6 son reguladas (en el hígado) por nutrientes (glucosa y grasa), hormonas (insulina) y agonistas de receptores nucleares (LXR y agonistas de PPAR α), así como por los factores de transcripción ChREBP, MLX, SREBP-1, PPAR y LXR.⁵⁹

5. Planteamiento del Problema

¿Cuál es la relación entre el cambio en la expresión génica de SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 en respuesta a la administración de un suplemento de omega 3 y los indicadores bioquímicos y antropométricos en individuos obesos de 10 a 16 años?

6. Justificación

La obesidad en la población pediátrica está asociada con el desarrollo de trastornos metabólicos como la dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión y síndrome metabólico los cuales influyen en la calidad de vida y a su vez representa un alto costo económico para el individuo y nuestro sistema de salud.

Ante el dramático incremento de la prevalencia de obesidad es fundamental tomar acciones contra ello, ampliando la perspectiva del tratamiento, ir más allá de la simple pérdida de peso y buscar sobretodo la reducción de las alteraciones metabólicas.

Las enfermedades metabólicas como la obesidad producen alteraciones en la composición lipídica sanguínea y hepática lo que repercute en la función de los factores de transcripción claves que modulan la expresión de las elongasas y desaturasas en estos y otros tejidos.

El uso de AGPI es una estrategia ya estudiada en otras poblaciones para aminorar las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad y describir su acción

sobre la modulación de enzimas promisorias como blancos terapéuticos en el tratamiento de la obesidad es en la población pediátrica una excelente opción.

7. Hipótesis

La suplementación dietética con ácidos grasos n-3, en dosis de 3000 mg diarios durante 12 semanas en individuos de 10 a 16 años producirá modulación de la expresión génica de SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 la cual disminuirá los niveles séricos de triglicéridos y colesterol, el peso corporal y el porcentaje de grasa.

8. Objetivos

OBJETIVO GENERAL.

- Determinar los cambios en la expresión relativa de los genes SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 en respuesta a la administración de ácidos grasos n-3 y su asociación con indicadores bioquímicos y antropométricos, en una población pediátrica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión del RNA mensajero de SCD1 y SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 al inicio y final del tratamiento.
- Correlacionar la expresión génica con los indicadores bioquímicos y antropométricos seleccionados.

- Correlacionar la expresión génica de SCD1 y SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 del de tejido adiposo subcutáneo y de células sanguíneas mononucleares en los individuos al finalizar el tratamiento.

9. Material y Métodos

9.1. Tipo de estudio

Estudio de intervención, analítico, prospectivo, longitudinal, autocontrolado.

9.2. Delimitación en espacio y tiempo

Hospital Infantil de México Federico Gómez, Escuela Superior de Medicina del IPN (Laboratorio de Biología Molecular) y Departamento de Gastroenterología, INCMNSZ. Marzo-Octubre 2010.

9.3. Población y muestra

Población: individuos obesos de 10 a 16 años pacientes del Hospital Infantil Federico Gómez, residentes del área metropolitana del Distrito Federal.

Muestra: no probabilística

Muestreo: por conveniencia

9.4. Criterios de inclusión

Se incluyeron en el grupo de estudio a sujetos entre 10 y 16 años de edad, de ambos géneros, con obesidad de origen exógeno de acuerdo a las tablas del CDC (IMC para la edad \geq P95), los sujetos fueron pacientes del Hospital Infantil Federico

Gómez procedentes del área metropolitana de la ciudad de México, con asentimiento por parte del menor y firma de consentimiento informado por los padres o tutores.

Fue necesario que el paciente y sus padres o tutores mostraran disposición total para la toma de sangre y biopsia de grasa subcutánea.

9.5. Criterios de exclusión

No se incluyeron a los pacientes con hipersensibilidad al aceite pescado, retardo mental, retraso en el desarrollo psicomotor, alteraciones del sistema nervioso central (epilepsia), enfermedades pulmonares, pacientes con cardiopatías, reflujo gastroesofágico, endocrinopatías (hipotalámica, tiroidea, Diabetes Mellitus tipo 1 o 2), hipertrigliceridemia familiar (triglicéridos mayores de 300 mg/dl e historia familiar de hipertrigliceridemia), hipercolesterolemia familiar, síndrome de ovario poliquístico o síndromes somatodismórficos (síndrome de Prader Willi, Barder-Biedl), uso de anticonceptivos, uso de vitaminas, síndrome nefrótico, enfermedades hepáticas, ascitis o edema, uso de medicamentos tricíclicos, clorpromacina, tioridazina, ácido valproico, carbamacepina, metformina, tabaquismo activo o ingesta de alcohol.

9.6. Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio a los pacientes que no asistieron a una cita de seguimiento, por decisión propia no terminaron el tratamiento, presentaron una ingestión menor al 90% del número de capsulas del suplemento, presentaron

persistente sintomatología gastrointestinal y a aquellos que retiraron su consentimiento informado.

9.7. Evaluación y Seguimiento

Evaluación Inicial

Previo a la firma del consentimiento informado, se realizó una historia clínica pediátrica completa, toma de medidas antropométricas, muestra de sangre venosa en ayuno (3 tubos de 6mL cada uno), biopsia de tejido adiposo subcutáneo, entrega del plan de alimentación y prescripción del consumo del suplemento alimenticio con AGPI n-3 (5 cápsulas por día, 3000 mg 1/3 EPA, 2/3 DHA), se explicó al paciente el calendario de monitoreo y su programación de citas.

Monitoreo

Mensualmente los pacientes acudieron al área de nutrición del departamento de alergias del HIFGM, donde fue revisado su apego al tratamiento.

Los pacientes registraron en el diario de apego y sintomatología gastrointestinal su consumo diario del suplemento tanto en la mañana como en la noche así como la presencia de síntomas gastrointestinales tales como: diarrea, náusea, vómito o presencia de heces grasosas.

A la par de realizar la entrega del diario de apego al tratamiento, los pacientes entregaron el frasco vacío al personal de nutrición el cuál contó las capsulas sobrantes en el frasco para comprobar el apego al tratamiento.

El apego a la dieta fue evaluado por la aplicación de un recordatorio de 24 horas y se reajustó la dieta cuando se consideró necesario.

Evaluación Final

Los pacientes asistieron en ayuno al finalizar las 12 semanas de tratamiento, se realizó el monitoreo mensual, la toma de mediciones antropométricas, se colectaron 3 tubos de sangre de 6 ml c/u para los análisis bioquímicos y de expresión génica y se tomó la biopsia de tejido adiposo subcutáneo.

9.8. Técnicas y procedimientos

Prescripción dietética y entrega del suplemento de AGPI n3

Todos los pacientes tuvieron una prescripción dietética de acuerdo a sus características individuales; la cuál fue ajustada realizando el cálculo de calorías totales y disminuyendo posteriormente entre el 15 y 20% del requerimiento energético total. La dieta cumplió la siguiente distribución de macronutrientes: 60% de hidratos de carbono, del 20 al 25% de lípidos y menos del 7% de grasas saturadas.

Fue entregado a los pacientes un formato de recomendaciones generales para llevar una dieta correcta, además de un plan de alimentación ajustado al sistema mexicano de alimentos equivalentes. Se explicó al paciente y a sus padres o tutores claramente la forma de seguir la dieta.

Se les entregó un frasco que contenía 160 cápsulas blandas de gelatina rellenas de AGPI omega-3, y se les indicó a los pacientes la dosis diaria la cual fue: tomar

5 cápsulas al día, 3 en la mañana y 2 en la noche, preferentemente después de los alimentos.

Antropometría y composición corporal

Se tomaron las siguientes medidas antropométricas: peso, talla, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera y se calculó el IMC y se evaluó la composición corporal (porcentaje de masa grasa y masa magra) por medio de bioimpedancia eléctrica tetrapolar.

Peso: se tomó estando el paciente sin zapatos, con la menor cantidad de ropa posible, colocándose de pie y con la vista al frente y los brazos suspendidos a los lados del cuerpo sobre una báscula.

Talla: se colocó al paciente de pie paralelo al estadímetro, (sin zapatos ni adornos para el cabello que pudieran interferir con la medición) procurando estuviera en contacto con la barra fija del estadímetro, se verificó que la cabeza se encontraría en el plano de Frankfurt y se tomó la medición colocando la barra móvil en el punto más alto del cráneo.

Circunferencia de cintura: con los pies ligeramente separados y los brazos separados extendidos ligeramente separados del cuerpo se tomó la medición entre el borde superior de la cresta iliaca y la última costilla, estando la cinta métrica de fibra de vidrio paralela al piso.

Circunferencia de cadera: estando el paciente con los pies ligeramente separados se pidió que cruzara los brazos sobre el pecho y se tomó la medición al nivel de la

prominencia máxima de los glúteos; la cinta métrica de fibra de vidrio se mantuvo paralela al piso.

Índice de Masa Corporal: se calculó utilizando la fórmula de Quetelet. $IMC (kg/m^2) = \text{Peso (kg)} / \text{Talla}^2 (m)$

Porcentaje de masa grasa y masa magra: Debido a que la bioimpedancia eléctrica tetrapolar se basa en un modelo bicompartamental, solamente uno de los componentes es medido, mientras que el otro es estimado por la diferencia. Masa magra = 100%-Masa grasa. Se tomó la medición en ayuno de 8-12 hrs, con ayuno de líquidos de al menos 4 horas con la cavidad vesical vacía, se colocó al paciente recostado sobre una superficie plana lo suficientemente ancha para colocar los brazos al costado del cuerpo sin que estos tuvieran contacto con el mismo y las piernas pudieran estar separadas, se pidió al paciente retirará todos los objetos metálicos de su cuerpo (llaves, monedas, aretes, cadenas) y se colocaron 4 electrodos, 2 en el dorso de la mano y 2 en el pie, superior a los nudillos y sobre la muñeca y a la altura del tobillo en la cara anterior del pie. Se hizo incidir una corriente eléctrica imperceptible a través del paciente y se registraron los datos entregados por el equipo: porcentaje de masa grasa y magra.

Toma de biopsia de tejido adiposo

Previa asepsia y antisepsia de la región abdominal, con infiltración de lidocaína al 2%, se tomó mediante sacabocado de 2mm de diámetro una muestra de tejido conteniendo piel y tejido celular subcutáneo, se realizó hemostasia y se cerró la herida de piel con un adhesivo tisular (cianocrilato), se procedió a colocar el

espécimen en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 500µl de RNA later para su almacenamiento temporal a -20°C.

Muestra de sangre

Previa asepsia y antisepsia, se tomó la muestra en ayuno por punción venosa en el pliegue del codo utilizando el equipo Vacutainer (BD Vacutainersystems, USA) y tubos tipo vacutainer con EDTA y para suero.

Análisis de la expresión génica

A su llegada al laboratorio de Biología Molecular de la ESM, las muestras fueron registradas y foliadas en orden progresivo, contándose con 2 categorías: “Sangre” y “Grasa”.

Extracción de RNA

Tejido Adiposo Subcutáneo (Biopsia)

Se extrajo RNA total de las biopsias de tejido adiposo subcutáneo (conservadas en RNA later) utilizando el GSI Total RNA Isolation Kit (Genemedsynthesis, Inc. San Antonio, TX. USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

- a) Se tomó la totalidad de la biopsia (20-100mg) y se cortó en trozos pequeños utilizando pinzas Kelly curvas y tijeras de disección de acero quirúrgico.
- b) Se homogenizó la muestra en 1 mL de reactivo GS1 (GSI Total Isolation Kit, Genemedsynthesis, San Antonio, TX, USA) utilizando un tubo de vidrio y un taladro con varilla plástica acondicionado para el proceso. La

homogenización se llevó a cabo colocando el tubo en contacto permanente con hielo para mantener una temperatura de aproximadamente 4°C.

- c) El homogenizado se transfirió a dos tubos Eppendorf® de 2mL (500µL en cada tubo) y se agregaron 100 µL de solución salina a cada uno de ellos. Se vortexeo por 10 segundos.
- d) Se adicionaron a cada tubo 500µL de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, se vortexeo 10 segundos y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- e) Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 13,500 rpm a 4°C.
- f) Por medio de la centrifugación el contenido del tubo se había separado en 3 fases (fase orgánica “ámbar-café”, interfase blanca y fase superior transparente que contenía el RNA). Se transfirió la fase superior transparente a 2 tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL (un tubo original a un tubo nuevo) y se agregaron 500µl de isopropanol frío (4°C).
- g) Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 13,500 rpm a 4°C.
- h) Se desechó el sobrenadante, conservando el “pellet” (colección sólida de RNA depositada en el fondo del tubo Eppendorf®, de color blanquecino), se agregó a cada tubo 1mL de etanol al 70% y se vortexeo levemente hasta que el pellet se separó del fondo del tubo evitando desintegrarlo.
- i) Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 7,500 rpm a 4°C.
- j) Se decantó el sobrenadante con cuidado de preservar el pellet y se colocaron los tubos en el speedVac para secar el pellet, este proceso duró entre 30 segundos y 2 minutos, evitando la desecación total del pellet.

- k) Se resuspendió el pellet en agua DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1%, de 10 a 50µl dependiendo del tamaño del pellet, se disolvió por pipeteo y se transfirió el contenido de los tubos a uno solo.
- l) Se incubó la muestra en baño María a 55°C por 10 minutos.
- m) La muestra fue almacenada a -70°C.

Células sanguíneas Mononucleares

La separación de células mononucleares se llevó a cabo por densidad tras centrifugación con polisacárido-ditrizoato de sodio Lymphoprep® (Axis-Shieldplc, Scotland).

- a) La sangre previamente fue colectada en tubos con anticoagulante (EDTA) y estos fueron agitados levemente por inversión de 8 a 10 veces.
- b) Se diluyeron 3 mL de sangre con 3 mL de solución salina al 0.9% en un tubo Falcón de 15 mL estéril.
- c) Se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL, 3 mL de Lymphoprep® y se agregó cuidadosamente la sangre diluida con solución salina (6mL), se evitó que se mezclaran las fases y no se agitó el tubo (Figura 8).
- d) Se centrifugó la muestra a 800 g (2000 rpm) por 30 minutos a temperatura ambiente (aprox 20°C).

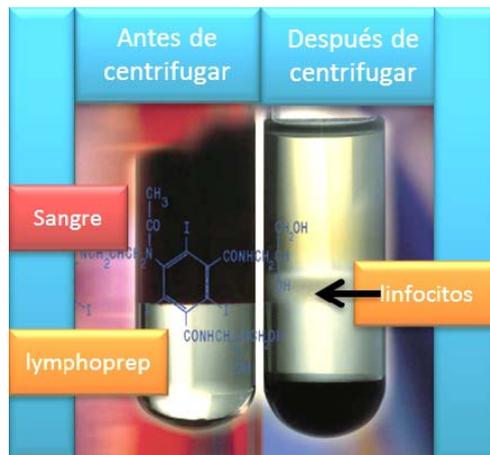


Figura 5 Fases en la separación de células mononucleares

- e) Se colectaron en un tubo Falcon nuevo las células mononucleares que se encontraban en la interfase, sin transferir la fase superior transparente (Figura 8).
- f) Se agregó a las células mononucleares solución salina hasta obtener 10 mL de volumen (para reducir la densidad de la solución) y se centrifugó 10 minutos a 250g (1200 rpm) a temperatura ambiente (20°C).

Se obtuvo un “pellet” blanquecino de células mononucleares el cuál posteriormente se trató por el método de isotiocianato de guanidina (TRizol® Reagent, Invitrogen, USA).

- a) Se agregó 1 mL de TRizol® al pellet de células mononucleares y se mezcló por pipeteo, se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- b) Se transfirió la mezcla anterior a un tubo Eppendorf® de 2mL y se homogenizó por medio de agitación (en vortex).

- c) Se agregaron 200 μ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente durante 15 segundos, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- d) Por medio de la centrifugación el contenido del tubo se había separado en 3 fases (fase orgánica “roja”, interfase blanca y fase superior transparente que contenía el RNA). La fase superior se transfirió por pipeteo a un tubo Eppendorf® de 1.5mL nuevo y se agregó a éste 500 μ L de isopropanol.
- e) La muestra se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm (g) a 4°C.
- f) Se desechó el sobrenadante con cuidado de mantener en el fondo del tubo el pellet de RNA.
- g) Se agregó 1mL de etanol al 75% al pellet y se vortexeo levemente hasta que el pellet se despegó del fondo del tubo.
- h) Se centrifugó la muestra a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- i) Nuevamente se desechó el sobrenadante y el pellet fue secado en el SpeedVac durante 30 segundos a 2 minutos, hasta estar parcialmente seco evitar perder su solubilidad.
- j) Se resuspendió el pellet en agua DEPC al 0.1%, de 10 a 50 μ l dependiendo del tamaño del pellet y se disolvió por pipeteo.
- k) Se incubó la muestra en baño María a 55°C por 10 minutos.
- l) La muestra fue almacenada a -70°C.

Cuantificación de RNA

Se cuantificó la concentración de RNA en la muestra por medio de espectrofotometría y se verificó su pureza (relación de absorbancias 260/280 = 1.8).

En pequeñas celdillas plásticas (capacidad 500µL) para espectrofotometría se colocaron 0,5µl de muestra (RNA) y 100µl de agua doble destilada para obtener un factor de dilución de 201. Posteriormente se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una absorbancia de 260 y 280 nm. Se estimó la concentración de RNA por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{RNA (ng/}\mu\text{L)} = (\text{DO a 260 nm}) \times (201) \times (40)$$

Integridad del RNA

Se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis horizontal en un microgel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

Microgel para visualizar RNA al 1% (Desnaturalizante) 20µl.

I. Reactivos

- 0.1gramos de agarosa
- 2 ml de MOPS (Ácido 3-N-monofolino-propanesulfónico) 5X
- 7.4 ml de agua doble destilada
- 0.6 ml de formaldehído al 37%
- 0.2µl de bromuro de etidio

II. Procedimiento

- Pesar 0.1 gramos de agarosa, combinarlos con el agua doble destilada y el MOPS5X en un matraz Erlenmeyer de 50 ml.
- Calentar la mezcla en el horno de microondas durante 30 segundos o hasta que la agarosa se haya disuelto.
- Retirar del microondas y dejar enfriar ligeramente, agregar el formaldehído y el bromuro de etidio poniendo en contacto la punta de la pipeta con la superficie de la solución.
- Mezclar ligeramente la solución y agregar al molde, los peines se han colocado previamente a una distancia de 5 mm del borde superior del inicio del mismo.
- Esperar a que el gel solidifique a temperatura ambiente, retirar los peines y retirar el gel con cuidado
- Conservar en refrigeración en una bolsa plástica con cierre hermético. Viabilidad aproximada 7-28 días.

Se cargaron en cada pozo del gel de agarosa (1% para RNA, desnaturizante) 2 μ l de RNA muestra (previa descongelación a temperatura ambiente) y 2 μ l de buffer de colorante de carga para RNA (azul de bromoferol, xilencianol y glicerol 40%), se colocó el gel dentro de la caja de electroforesis horizontal llenándola hasta cubrir ligeramente el gel con buffer para RNA (MOPS 1%) y se corrió a 60 Volts durante 15-25 minutos. Se observó el gel utilizando un transiluminador de luz ultra violeta para verificar la presencia de las bandas de RNA y visualizar su grado de degradación.

Síntesis de cDNA

La síntesis de ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria (cDNA) se realizó con el kit Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche AppliedSystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- a) Se colocaron en microtubos de 200µl de capacidad especiales para termociclador de bloque: 1 µg de RNA (previa descongelación-volumen variable), 2µl de Random Hexamer primer (600 pmol/µl) y agua grado PCR hasta obtener un volumen de 13 µl.
- b) Para garantizar la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA se incubó la muestra en un termociclador de bloque con la tapa precalentada, 10 minutos a 65°C.
- c) Posteriormente, el tubo con la muestra se colocó inmediatamente en hielo.
- d) Se agregó al tubo una mezcla preparada con los siguientes componentes: 4 µl del buffer de reacción de transcripción de la transcriptasa reversa 5X, 0.5µl de inhibidor de RNAsas, 2 µl de deoxinucleótidos (dNTPs) a 1mM cada uno, 0.5µl de enzima transcriptasa reversa (20U/µl).
- e) Se mezcló cuidadosamente la reacción por pipeteo y se centrifugo brevemente (5 segundos a 2000 rpm) para depositar los componentes en el fondo del tubo.
- f) Se procedió a la amplificación utilizando el siguiente esquema de temperatura en un termociclador de bloque con tapa precalentada:
 - 10 minutos a 25°C
 - 30 minutos a 55°C

- (Inactivación) 5 minutos a 85°C
- g) La muestra se colocó en hielo para su procesamiento inmediato o se mantuvo en congelación a -20°C para utilizarse posteriormente.

Amplificación de genes seleccionados

Posteriormente se amplificó el cDNA utilizando oligonucleótidos iniciadores y sondas específicas (Universal Probelibrary Set, human. Roche applied-science) para los genes de SCD1, SCD5, Elovl5 y Elovl6, así como para el gen constitutivo 18S (Anexo).

El rendimiento estándar de la síntesis de cDNA fue de 1000 ng/μl por lo cual se utilizó 1 μl de cDNA en cada reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT). Se utilizó el LigthcylerTaqman Master kit en el termociclador de carrusel Ligthcyler 1.5 (Roche applied-science), preparando las reacciones en capilares de borosilicato de 20μl.

- a) Para la amplificación de cada muestra para cada gen individual se preparó la siguiente mezcla (se mantuvieron todo el tiempo los reactivos en hielo):
 - a. 6.5μl de agua grado PCR
 - b. 0.2μl de oligonucleótidos iniciadores (derecho) a 10mM
 - c. 0.2μl de oligonucleótidos iniciadores (izquierdo) a 10mM
 - d. 2.0μl de Master Mix Taqman (preparado tras la adición de 10μl de enzima (Taq polimerasa) en un vial de Mix de Reacción)
 - e. 0.1μl de Sonda específica (Universal Probelibrary Set, human. Roche)

- b) Se homogenizaron los componentes por pipeteo y se colocó la mezcla en un capilar de borosilicato a 4°C (Uso de Cooling block, Roche).
- c) Se agregó en la parte superior del capilar 1µl de cDNA problema, se colocó la tapa al capilar y se centrifugó brevemente haciendo uso de un adaptador para centrifuga (LigthCycler® centrifugeadapters, Roche applied-science). La centrifugación fue a 3000rpm durante 30 segundos.
- d) El capilar se colocó dentro del termociclador Ligthcycler y se amplificó el gen de acuerdo al siguiente esquema de temperaturas:
 - a. Preincubación (1 ciclo): 95°C durante 10 minutos
 - b. Amplificación (45 ciclos)
 - Desnaturalización: 95°C durante 10 segundos
 - Alineación: 65°C durante 40 segundos
 - Extensión: 72°C durante 1segundo
 - c. Enfriamiento (1 ciclo): 40°C durante 30 segundos
- e) Se registró el Cross point (CP) para cada gen.

Se ajustó la expresión del gen constitutivo a una dilución de 1:1000 ya que fue la correspondiente a la expresión de los genes seleccionados tomando como referencia el CP.

La normalización de la expresión por el gen constitutivo se expresa de acuerdo al cambio (número de veces) relativo de la expresión del gen blanco de acuerdo al estado basal del paciente, tomando como referencia la expresión del gen 18S.

9.9. Definición de las variables y unidades de medida

Variable independiente: Suplemento de omega 3

Variables dependientes (expresión génica):

- Expresión génica SCD1 en grasa
- Expresión génica Elovl5 en grasa
- Expresión génica Elovl6 en grasa
- Expresión génica SCD5 en grasa
- Expresión génica SCD1 en células sanguíneas mononucleares
- Expresión génica Elovl5 en células sanguíneas mononucleares
- Expresión génica Elovl6 en células sanguíneas mononucleares
- Expresión génica SCD5 en células sanguíneas mononucleares

Variables dependientes (antropométricas) (todas consideradas al inicio y final del estudio y sus diferencias entre el estado final e inicial)

- Peso
- Talla
- IMC
- Circunferencia de cintura
- Circunferencia de cadera
- Porcentaje de grasa corporal
- Porcentaje de masa magra

Variables dependientes (bioquímicas) (todas consideradas al inicio y final del estudio y sus diferencias entre el estado final e inicial)

- Triglicéridos
- Colesterol Total
- Colesterol HDL
- Colesterol LDL
- Glucosa

| Variable | Definición Operativa | Tipo de Variable | Escala de Medición | Clasificación/ Categorías | Unidad de medición |
|----------------------------------|--|-----------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| Género | Condición biológica femenina o masculina del paciente. | Cualitativa | Dicotómica | Hombre Mujer | NA |
| Edad | Años y meses cumplidos desde el nacimiento hasta el momento de la intervención. | Cuantitativa continua | De razón | NA | Años |
| Suplemento omega 3 | Consumo de 3000mg de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 al día, en 2 tomas, 3 cápsulas por la mañana y 2 cápsulas por la noche. | Cualitativa | Dicotómica | Si No | NA |
| Obesidad | Índice de masa corporal mayor o igual al percentil 95 para edad y género de acuerdo a las tablas del CDC | Cualitativa | Dicotómica | Si No | NA |
| Peso | Masa del sujeto en kilogramos | Cuantitativa continua | De razón | NA | Kg |
| Talla | Estatura del sujeto medida en posición vertical desde la base de los pies hasta el punto más alto del cráneo. | Cuantitativa continua | De razón | NA | Cm |
| IMC | Cociente entre el peso y la talla al cuadrado del sujeto. | Cuantitativa continua | De razón | NA | Kg/m ² |
| Circunferencia de cintura | Perímetro del tronco a nivel del punto medio entre la cresta iliaca y la última costilla. | Cuantitativa continua | De razón | NA | Cm |
| Masa grasa | Porcentaje de tejido adiposo visceral y subcutáneo en el individuo estimado por impedancia bioeléctricatetra frecuencia. | Cuantitativa continua | De razón | NA | % |
| Masa magra | Porcentaje de tejido magro en el cuerpo del paciente estimado por impedancia bioeléctricatetra frecuencia. | Cuantitativa continua | De razón | NA | % |
| Triglicéridos * | Concentración plásmática de triglicéridos | Cuantitativa continua | De razón | NA | mg/dL |
| Colesterol* | Concentración de colesterol total en el plasma | Cuantitativa continua | De razón | NA | mg/dL |
| HDL* | Concentración de lipoproteínas de alta densidad en el plasma | Cuantitativa continua | De razón | NA | mg/dL |
| LDL* | Concentración de lipoproteínas de baja densidad en el plasma. Obtenido por la fórmula de Friedewald: LDL= CT - (HDL + TG/5) | Cuantitativa continua | De razón | NA | mg/dL |
| Glucosa* | Concentración de glucosa en suero. | Cuantitativa | De razón | NA | mg/dL |

| continua | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------------|----------|----|---|
| SCD1-grasa | Expresión relativa del gen SCD1 en tejido adiposo relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| Elov5-grasa | Expresión relativa del gen Elov5 en tejido adiposo relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| Elov6-grasa | Expresión relativa del gen Elov6 en tejido adiposo relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| SCD5-grasa | Expresión relativa del gen SCD5 en tejido adiposo relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| SCD1-mononuclea res-sangre | Expresión relativa del gen SCD1 en células sanguíneas mononucleares relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| Elov5-mononuclea res-sangre | Expresión relativa del gen Elov5 en células sanguíneas mononucleares relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| Elov6-mononuclea res-sangre | Expresión relativa del gen Elov6 en células sanguíneas mononucleares relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |
| SCD5-mononuclea res-sangre | Expresión relativa del gen SCD% en células sanguíneas mononucleares relativo a la condición basal del paciente normalizada por el gen de referencia 18s. | Cuantitativa Continua | De razón | NA | Incremento de la expresión respecto al basal. |

*Niveles bajo ayuno de 8-12 hrs

9.10. Técnicas de análisis estadístico

Fue determinada la normalidad de las variables por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas continuas; las variables cualitativas fueron

expresadas como razones, el efecto de la intervención en la expresión génica se realizó utilizando la prueba de Wilcoxon, el subanálisis por género en la expresión génica se realizó con la prueba de U de Mann Whitney.

La comparación en el grupo pre y post-tratamiento para las variables bioquímicas y antropométricas se efectuó por medio de la prueba t de student para muestras pareadas.

La asociación entre las pruebas de biología molecular, las variables antropométricas y los datos bioquímicos se analizó por medio de correlación bivariada (Rho de Spearman para variables no paramétricas).

Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos fueron procesados con el programa estadístico SPSS 17 (SPSS Inc, Indiana University).

9.11. Consideraciones éticas

El proyecto fue realizado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y aprobado por el comité de Ética del Hospital Infantil Federico Gómez.

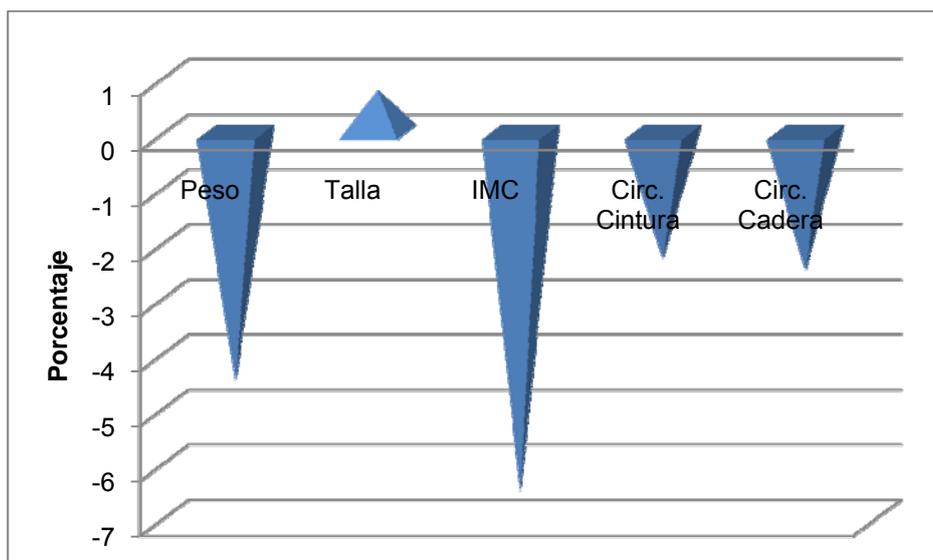
10. Resultados

La muestra total se conformó por 18 pacientes que finalizaron el tratamiento satisfactoriamente, las características generales de esta población al inicio y final de la intervención se muestran en la tabla 4.

| Tabla 4 Características de la población al inicio y final del estudio. | | | | |
|--|------------|------------|----------|----|
| Variable | Basal | Final | Δ | p* |
| Género (M/F) | 12/6 | | | |
| Edad (años) | 12.45±1.81 | 12.85±1.81 | 0.25 | |

| | | | | |
|----------------------------------|--------------|-------------|-------|-------|
| Peso | 66.41±13.69 | 63.40±12.77 | -3.01 | 0.001 |
| Talla | 155.47±10.02 | 156.68±9.36 | 1.21 | 0.000 |
| IMC | 27.50±2.81 | 25.70±3.15 | -1.80 | 0.000 |
| Circunferencia de cintura | 88.35±8.30 | 86.33±7.55 | -2.02 | 0.043 |
| Circunferencia de cadera | 97.03±8.14 | 94.60±7.24 | -2.43 | 0.000 |
| % Grasa corporal | 37.79±7.63 | 34.60±4.01 | -3.19 | 0.174 |
| % Masa magra | 62.22±7.64 | 65.39±4.01 | 3.17 | 0.177 |
| *Prueba t para muestras pareadas | | | | |

Los resultados mostraron una reducción significativa en la mayoría de las variables antropométricas al final de la intervención (peso, IMC, circunferencia de cintura y circunferencia de cadera), así mismo se incrementó significativamente la estatura de los pacientes ($p=0.001$).



Gráfica 1. Porcentaje de cambio al final de la intervención de las variables antropométricas con significancia estadística ($p<0.05$). Población general.

En promedio, los individuos perdieron un 4.5% de su peso inicial en tres meses, que aunado al aumento fisiológico de estatura representó un descenso de 6.5%

del IMC; la disminución de circunferencia de cintura fue de 2.02 cm y de circunferencia de cadera de 2.4 cm, expresado en porcentaje en la Gráfica 1.

En la medición final se observó una importante reducción en los triglicéridos ($p=0.002$) sin cambios en la glucosa en ayuno, el colesterol total y el colesterol HDL. Aunque no de forma significativa, el colesterol LDL se elevó en promedio 24 mg/dL (Tabla 5).

| Variable | Basal | Final | Δ | p* |
|------------------|--------------|--------------|----------|-------|
| Glucosa en ayuno | 85.88±11.85 | 86.75±8.90 | 0.87 | 0.801 |
| Triglicéridos | 231.25±64.85 | 95.75±28.40 | -135.50 | 0.002 |
| Colesterol Total | 165.25±36.61 | 160.63±40.73 | -4.65 | 0.716 |
| HDL | 32±4.84 | 30.37±7.13 | -1.62 | 0.498 |
| LDL | 87±37.21 | 111.1±36.58 | 24.10 | 0.062 |

*Prueba t para muestras pareadas

Se evaluó la etapa de desarrollo puberal en 16 de los 18 individuos (tabla 6), encontrando un total de 2 individuos en etapa prepuberal (Tanner 1) y mujeres en etapa puberal (5, 0.83 del total) y hombres en etapa puberal (9, 0.9 del total). No se realizaron comparaciones entre el grupo prepuberal y puberal debido al tamaño de la muestra.

| | Prepuberal | Puberal | | | Adulto |
|---------|------------|---------|---------|----------|----------|
| Tanner | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Hombres | 1 (0.1) | 4 (0.4) | 1 (0.1) | 4 (0.4) | - |
| Mujeres | 1 (0.16) | 3 (0.5) | - | 1 (0.16) | 1 (0.16) |

Los datos expresan: número de pacientes con la característica (proporción de la característica de acuerdo al género)

Efecto de la suplementación con ácidos grasos omega tres en las variables antropométricas y bioquímicas por género.

Debido a la variabilidad fisiológica y el dimorfismo sexual de los integrantes de la muestra (pubertad-adolescencia), se realizó el análisis por género.

En los varones, hubo una disminución significativa en el peso, IMC, circunferencia de cintura y cadera, la talla aumentó ($p=0.003$), mientras que el porcentaje de masa grasa presentó una disminución no significativa, el comportamiento de la masa magra fue similar en todos los análisis (Tabla 7).

| Tabla 7. Características de la población por género (Masculino), Basal y final de la intervención | | | | |
|---|--------------|--------------|----------|-------|
| Variable | Basal | Final | Δ | p^* |
| Edad (años) | 12.34±1.85 | 12.59±1.85 | 0.25 | |
| Peso | 67.01±15.74 | 63.99±14.67 | -3.02 | 0.003 |
| Talla | 156.30±11.39 | 157.51±10.67 | 1.27 | 0.003 |
| IMC | 26.99±2.94 | 25.54±2.89 | -1.45 | 0.000 |
| Circunferencia de cintura | 88.83±8.46 | 86.05±8.03 | -2.77 | 0.019 |
| Circunferencia de cadera | 96.55±8.98 | 93.74±7.62 | -2.81 | 0.001 |
| % Grasa corporal | 39.03±7.69 | 33.51±4.03 | -5.52 | 0.057 |
| % Masa magra | 60.97±7.69 | 66.49±4.03 | 5.52 | 0.57 |
| *Prueba t para muestras pareadas | | | | |

Los triglicéridos disminuyeron aproximadamente 131 mg/dL en los varones estudiados ($p=0.017$) y no ocurrieron cambios significativos en el resto de las variables bioquímicas (Tabla 8), esto es similar a lo ocurrido al analizar en conjunto los datos de hombres y mujeres.

Tabla 8. Comparación de los parámetros bioquímicos en el género Masculino al inicio y final del estudio.

| Variable | Basal | Final | Δ | p* |
|------------------|--------------|-------------|----------|-------|
| Glucosa en ayuno | 87.83±12.35 | 88.83±9.45 | 1.0 | 0.823 |
| Triglicéridos | 226.50±72.44 | 95.33±33.54 | -131.16 | 0.017 |
| Colesterol Total | 156.83±39.04 | 145.0±32.06 | -11.83 | 0.442 |
| HDL | 30.33±4.22 | 28.66±5.88 | -1.66 | 0.573 |
| LDL | 81.200±14.10 | 97.26±30.33 | 16.06 | 0.216 |

*Prueba t para muestras pareadas

En las mujeres no existieron cambios significativos en las variables antropométricas (Tabla 9), sin embargo se observó un aumento en la circunferencia de cintura y el porcentaje de grasa corporal ($p>0.05$).

TABLA 9. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN POR GÉNERO (FEMENINO), Basal y final de la intervención

| Variable | Basal | Final | Δ | p* |
|---------------------------|-------------|-------------|----------|-------|
| Edad (años) | 12.68±1.87 | 12.93±1.87 | 0.25 | |
| Peso | 64.96±8.01 | 62.00±7.51 | -2.96 | .226 |
| Talla | 153.48±6.19 | 154.68±5.52 | 1.20 | 0.90 |
| IMC | 27.63±3.53 | 26.09±4.06 | -1.54 | 0.155 |
| Circunferencia de cintura | 86.90±8.84 | 87.15±6.90 | 0.25 | 0.897 |
| Circunferencia de cadera | 98.45±5.67 | 97.17±6.11 | -1.27 | 0.269 |
| % Grasa corporal | 34.70±7.55 | 37.35±2.64 | 2.65 | 0.473 |
| % Masa magra | 65.37±7.53 | 62.65±2.64 | -2.72 | 0.458 |

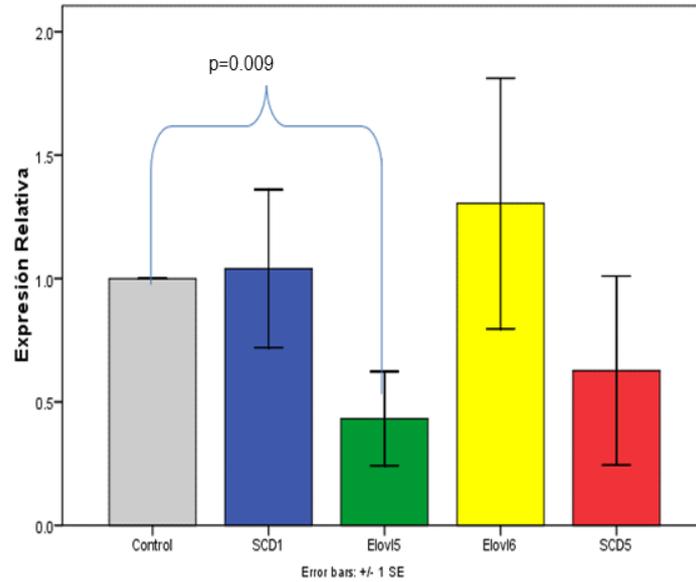
*Prueba t para muestras pareadas

En cuanto a los valores de los parámetros bioquímicos al inicio y final de la intervención no existieron diferencias significativas. La muestra en esta categoría se redujo a 2 individuos con análisis bioquímicos completos lo que hizo perder poder estadístico al análisis (Tabla 10).

| Tabla 10. Comparación de los parámetros bioquímicos en el género Femenino al inicio y final del estudio. | | | | |
|--|--------------|--------------|----------|-------|
| Variable | Basal | Final | Δ | p* |
| Glucosa en ayuno | 80.00±11.31 | 80.50±2.12 | 0.50 | 0.951 |
| Triglicéridos (n=2) | 245.50±51.61 | 97.00±4.24 | -148.5 | 0.141 |
| Colesterol Total | 190.50±7.77 | 207.50±24.79 | 17.0 | 0.595 |
| HDL | 37.00±2.82 | 35.50±10.60 | -1.5 | 0.830 |
| LDL (n=2) | 104.40±20.93 | 152.60±13.29 | 48.20 | 0.296 |
| *Prueba t para muestras pareadas | | | | |

Comparación en la expresión génica, estado inicial y final.

Uno de nuestros objetivos fue analizar el cambio en la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo, los resultados mostraron diferencias en la expresión génica relativa (mRNA) solo en Elov15, la cual disminuyó su expresión respecto al estado basal ($p=0.005$) (Gráfica 2). La mayor variación se observó en la expresión de Elov6 (desviación estándar 2.032), y la expresión de SCD5 (0.4325 ± 0.8105) y Elov15 (0.6273 ± 1.1486) disminuyeron sin ser significativo (tabla 11).



Gráfica 2 Expresión génica relativa. Post-intervención. Tejido Adiposo Subcutáneo. n =18

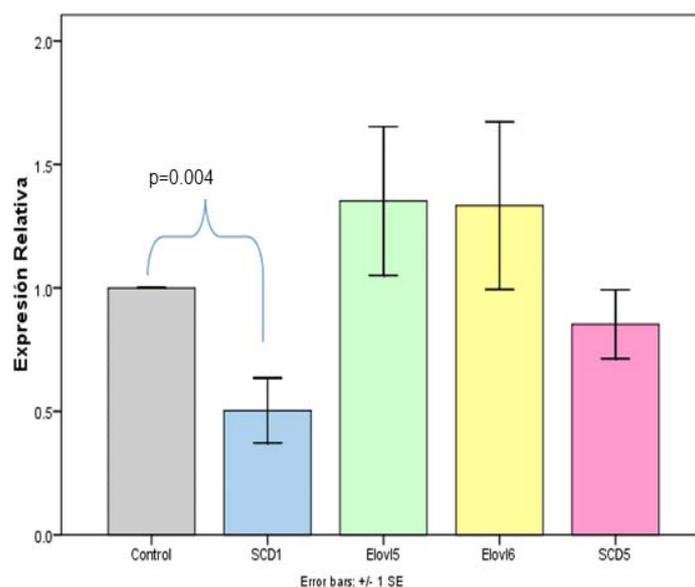
| Gen (n) | Media | Desviación estándar | p* |
|-------------|--------|---------------------|----------|
| SCD1 (18) | 1.0405 | 1.3582 | 0.901** |
| Elovl5 (18) | 0.4326 | 0.8105 | 0.009** |
| Elovl6 (16) | 1.3041 | 2.0320 | 0.679*** |
| SCD5 (9) | 0.6273 | 1.1486 | 0.359** |

*Respecto al estado basal del paciente. **Prueba t para muestras pareadas.
***Test de Wilcoxon

Las variables SCD1, Elovl5 y SCD5 tuvieron una distribución normal, mientras que Elovl6 tuvo una distribución no normal, por lo que esta última fue tratada con pruebas no paramétricas (Wilcoxon) (tabla 11).

En cuanto a las células mononucleares, se observó una diferencia significativa en SCD1 respecto al estado basal o control ($p=0.016$) (Gráfica 3). La expresión de

Elovl5 (1.3520 ± 0.9992) y Elovl6 (1.3329 ± 1.2566) tendió a aumentar, aunque el cambio no fue significativo (Tabla 12).



Gráfica 3 Expresión génica relativa. Post-intervención. Células sanguíneas mononucleares. n=11

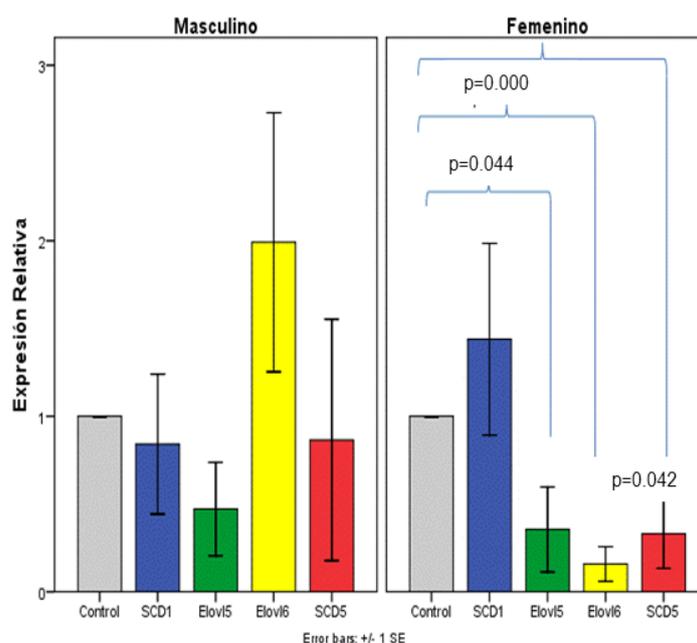
| Tabla 12. Expresión génica relativa en células sanguíneas mononucleares | | | |
|---|--------|---------------------|---------|
| Gen (n) | Media | Desviación estándar | p* |
| SCD1 (11) | 0.5036 | 0.4370 | 0.004** |
| Elovl5 (11) | 1.3520 | 0.9992 | 0.270** |
| Elovl6 (11) | 1.3329 | 1.2566 | 0.350** |
| SCD5 (11) | 0.8535 | 0.4619 | 0.316** |

*Respecto al estado basal del paciente. **Prueba t para muestras pareadas.

Variación en la expresión génica por género

La distinta composición corporal en hombres y mujeres, llevó a la verificación de los cambios de expresión génica por sexo. Los resultados mostraron que no hubo cambios significativos en la expresión génica en el caso de los hombres, mientras que en las mujeres la expresión de Elovl6 se disminuyó francamente ($p=0.000$).

La expresión de Elovl5 disminuyó en las mujeres (0.3548 ± 0.5923 , $p=0.044$). Por su parte la expresión de SCD5 disminuyó (0.33 ± 0.3931 , $p=0.042$) (Gráfica 4, Tabla 13).

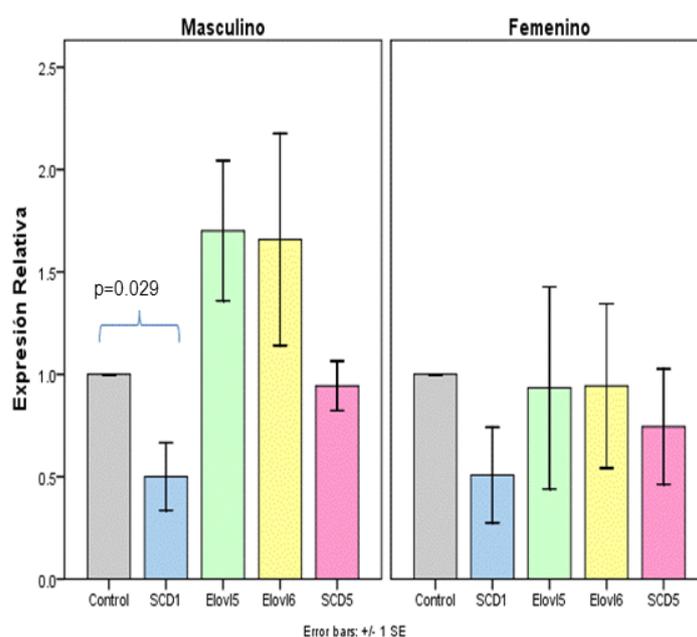


Gráfica 4 Expresión génica relativa en tejido adiposo, por género

| Tabla 13. Expresión génica relativa en tejido adiposo, ajustada por género | | | | | | |
|--|---------|---------------------|-------|---------|---------------------|-------|
| Gen (n hombres, n mujeres) | Hombres | | | Mujeres | | |
| | Media | Desviación estándar | p* | Media | Desviación estándar | p* |
| SCD1(12, 6) | 0.8413 | 1.3008 | 0.698 | 1.4389 | 1.3384 | 0.458 |
| Elovl5 (12,6) | 0.4715 | 0.9224 | 0.073 | 0.3548 | 0.5923 | 0.044 |
| Elovl6 (10,6) | 1.9915 | 2.3344 | 0.212 | 0.1584 | 0.2415 | 0.000 |
| SCD5 (5,4) | 0.8651 | 1.5375 | 0.854 | 0.3300 | 0.3931 | 0.042 |

**Respecto al estado basal del paciente. **Prueba t para muestras pareadas.

En células mononucleares no se encontraron diferencias en la expresión génica para mujeres, mientras que en los hombres se observó una disminución de SCD1 (0.5001 ± 0.40520 , $p=0.029$) y no hubo cambios adicionales en la expresión del resto de los genes (gráfica 5, tabla 14)



Gráfica 5. Expresión génica en células mononucleares sanguíneas por género

| Gen (n hombres, n mujeres) | Hombres | | | Mujeres | | |
|----------------------------|---------|---------------------|--------------|---------|---------------------|-------|
| | Media | Desviación estándar | p* | Media | Desviación estándar | p* |
| SCD1 (6,5) | 0.5001 | 0.4050 | 0.029 | 0.5079 | 0.5219 | 0.103 |
| Elov5 (6,5) | 1.7000 | 0.8381 | 0.096 | 0.9334 | 1.1030 | 0.899 |
| Elov6 (6,5) | 1.6579 | 1.2686 | 0.260 | 0.9430 | 0.8987 | 0.894 |

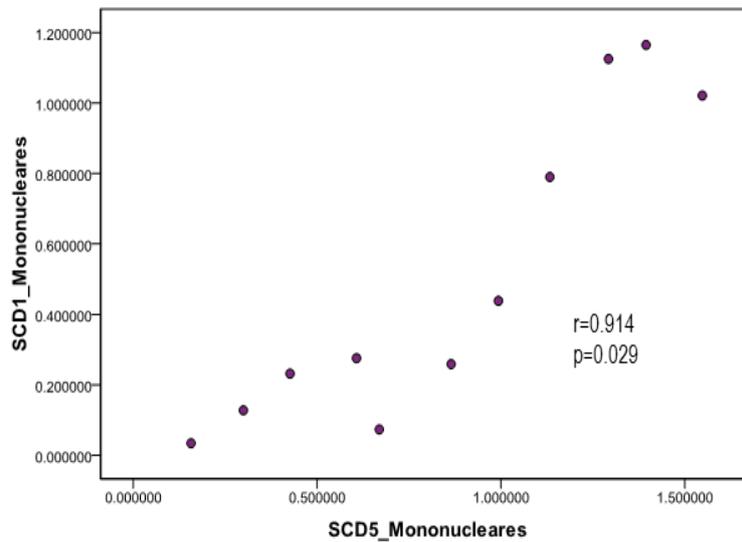
| | | | | | | |
|---|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
| SCD5 (6,5) | 0.9435 | 0.2955 | 0.660 | 0.7445 | 0.6303 | 0.416 |
| **Respecto al estado basal del paciente. **Prueba t para muestras pareadas. | | | | | | |

Relación de la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo y células sanguíneas mononucleares

Con la finalidad de encontrar si la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo pudiera reflejarse en la expresión a nivel sanguínea se realizó una prueba de correlación simple. Los resultados mostraron que no se encontró correlación entre la expresión génica en ambos tejidos ya que el valor de significancia estadística fue mayor a 0.05 en todos los casos (Tabla 15).

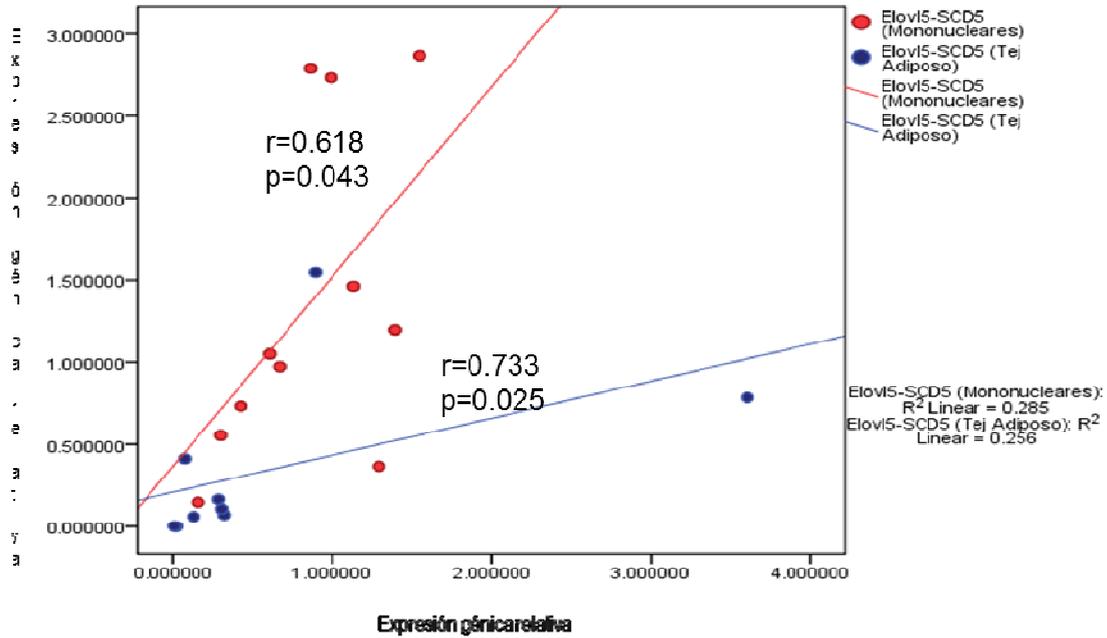
| Tabla 15. Relación en la expresión génica de tejido adiposo y células sanguíneas mononucleares | | |
|--|--------|---------|
| | r | p |
| SCD1 | -0.208 | 0.539* |
| Elovl5 | 0.312 | 0.350* |
| Elovl6 | 0.383 | 0.308** |
| SCD5 | 0.394 | 0.382* |
| *Pearson. **Rho de Spearman | | |

Para estimar la relación entre la expresión de SCD1 y su isoforma SCD5, se evaluó si existía una correlación entre la expresión de los genes estudiados en ambos tejidos. Se encontró que la expresión de SCD1 y SC5 (ambas en células mononucleares) se da de manera coordinada; prácticamente todos los aumentos de SCD1 se reflejan en aumentos de SCD5 ($r=0.914$, $p=0.000$) (Gráfica 6). Este comportamiento no se observa al correlacionar SCD1 y SCD5 en tejido adiposo ($p=0.705$).



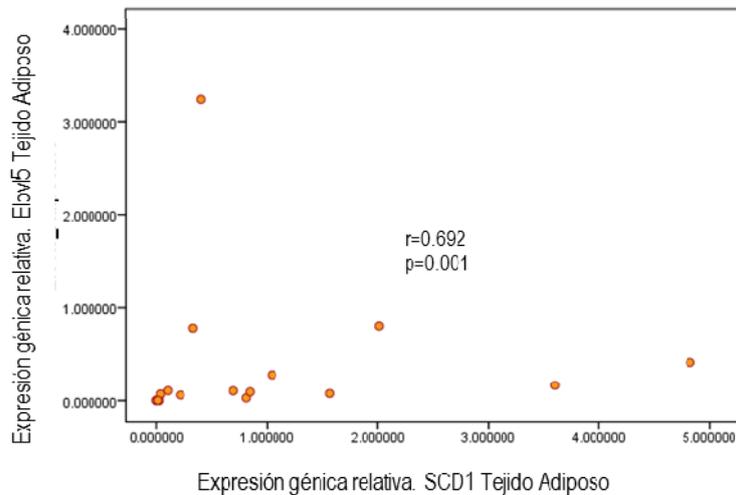
Gráfica 6. Correlación de la expresión génica relativa de SCD1 y SCD5 en células sanguíneas mononucleares

La expresión de Elovl5 y SCD5 se correlacionaron tanto en tejido adiposo ($r=0.733$, $p=0.025$) como en células sanguíneas mononucleares ($r=0.618$, $p=0.043$). La gráfica se encuentra expresada con la correlación de los genes en cada tejido (Elovl5 en células mononucleares contra SCD5 en células mononucleares y, Elovl5 en tejido adiposo contra SCD5 en tejido adiposo). Los ejes corresponden a unidades relativas de expresión génica y se pueden observar la totalidad de pacientes y la línea de regresión para ambos pares de variables. Se identifican en distintos colores los pares de variables; rojo para células mononucleares y azul para tejido adiposo (Gráfica 7). Se puede observar que a pesar de la fuerte correlación, el cambio en el valor de Elovl5 en células mononucleares solamente explica el 28.5% de la variabilidad de la misma; y en el caso del tejido adiposo, la variación de Elovl5 explica el 25.6% del valor de SCD5 (Gráfica 7, valor r^2).



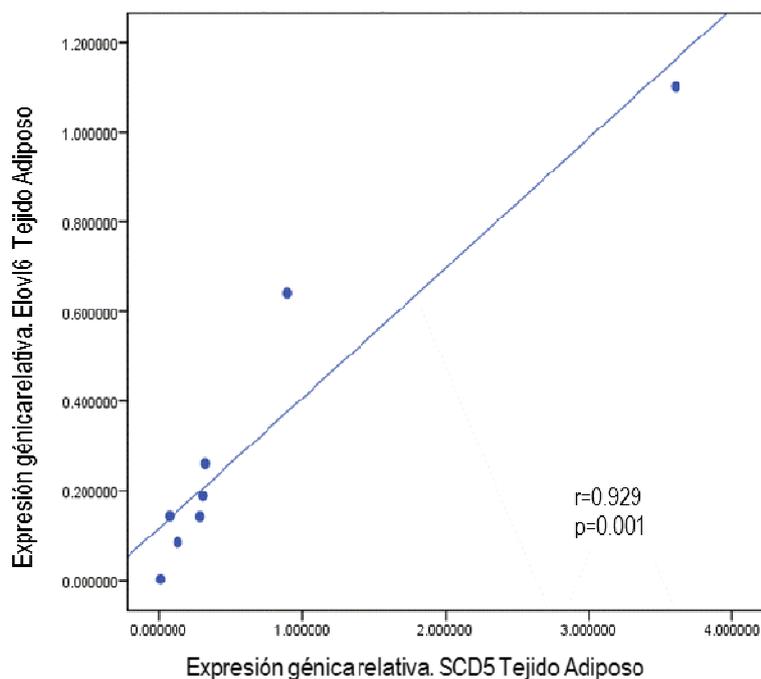
Gráfica 7 Correlación de la expresión de Elovl5 y SCD5 en células mononucleares y tejido adiposo

En tejido adiposo, la expresión de Elovl5 también se vio relacionada con la expresión de SCD1 ($r=0.692$, $p=0.001$) como se muestra en la gráfica 8, la correlación es discreta pero significativa.



Gráfica 8. Correlación en la expresión génica de SCD1 y Elovl5 en tejido adiposo

Mientras tanto, la expresión de Elovl6 se relacionó con la expresión de SCD5 en tejido adiposo ($r=0.929$, $p=0.001$). Parece existir un efecto biológico que une a la poco descrita isoforma de SCD1 y las elongasas 5 y 6. (Gráfica 9).

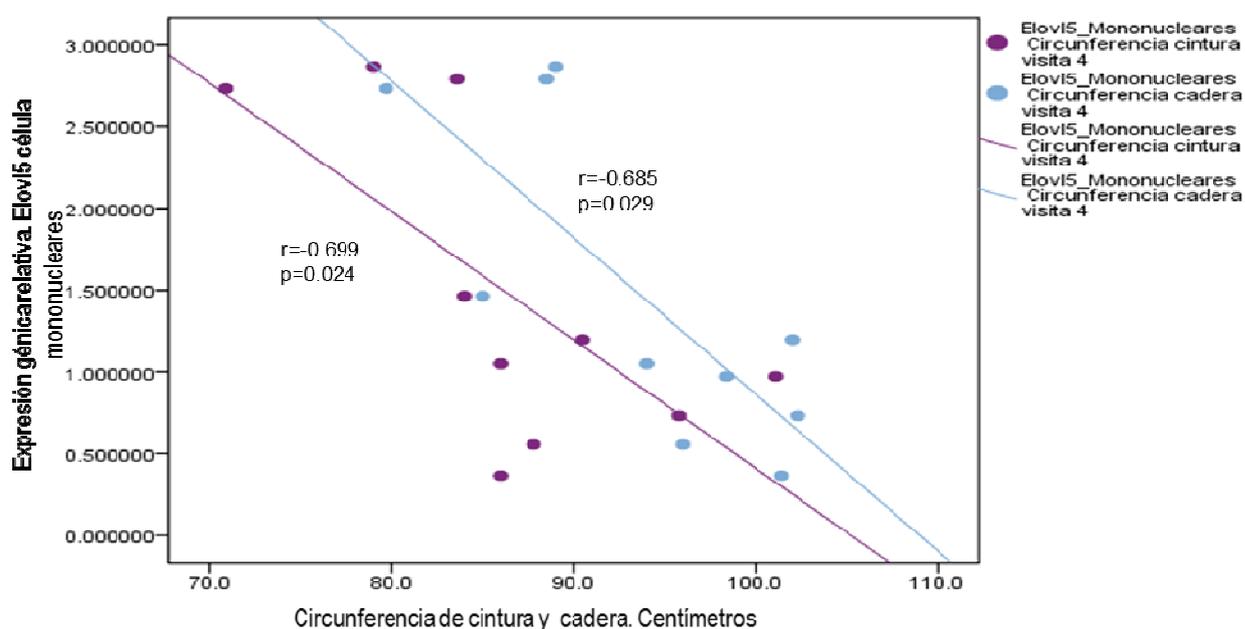


Gráfica 9. Correlación de la expresión génica de Elovl6 y SCD5 Tejido Adiposo

Asociación de la expresión génica con las variables antropométricas y bioquímicas

La expresión de SCD1 en tejido adiposo se correlacionó positivamente con la variación en el porcentaje de masa grasa ($r=0.662$, $p=0.10$). El incremento de expresión de SCD1 en tejido adiposo correlacionó negativamente con la disminución en el porcentaje de masa grasa (delta), al final de la intervención ($r=-0.649$, $p=0.12$).

Puede verse que la el incremento en la expresión de Elovl5 en células mononucleares se relacionó con una menor circunferencia de cintura ($r=-0.699$, $p=0.024$) y cadera ($r=-0.685$, $p=0.029$) (Gráfica 10), ambos valores al final de la intervención. De esta forma, existe una asociación entre la expresión de Elovl5 y la composición corporal a nivel abdominal, mayor Elovl5, menor circunferencia de cintura y cadera.



Gráfica 10. Correlación de la expresión génica de Elovl5 en células mononucleares con la circunferencia de cintura y cadera

Respectivo a los parámetros bioquímicos; no existió relación entre el cambio en los triglicéridos y la expresión génica ($p>0.60$). Sin embargo se observó una asociación no esperada entre la cifra de colesterol HDL en la visita final (30.37 ± 7.13 mg/dl) y la expresión de Elovl5 en el tejido adiposo ($r=0.802$, $p=0.017$). Y de

la variación de colesterol total (-4.6 ± 34 mg/dL) con Elov15 en tejido adiposo ($r=0.786$, $p=0.021$). El aumento de Elov15 en tejido adiposo se asocia a un HDL más alto y a una disminución del colesterol total, dando una condición benéfica a la salud cardiovascular.

11. Discusión

Los AGPI n3 disminuyen los triglicéridos en obesos de 10 a 16 años

La disminución de los triglicéridos no puede explicarse por cambios en la expresión de SCD1. Algunos autores han encontrado que a nivel hepático la administración de EPA y DHA inhiben la acil-CoA 1,2-diacilglicerol aciltransferasa, con lo cual disminuye la síntesis de triglicéridos en este tejido, además actúan incrementando la actividad de la lipoprotein lipasa produciendo un incremento en la depuración de triglicéridos⁶¹. Debido a que el número de genes evaluado en nuestro estudio fue pequeño y no incluye a estas importantes enzimas, podría enmascarse el efecto de la modulación de SCD1 por los AGPI n3 con los mayores efectos presentados en las enzimas mencionadas, de esta forma en el presente estudio no puede atribuirse a SCD1 la variación de los triglicéridos, pero tampoco puede imputarse el cambio a otras enzimas encontradas en estudios anteriores debido a que no fue evaluada su expresión.

El consumo de AGPI n-3 puede incrementar el LDL con una disminución mínima del HDL

Aunque no de forma significativa, el LDL tendió a aumentar en nuestros pacientes, se ha reportado que los AGPI omega 3 pueden incrementar el nivel de LDL; no

obstante el perfil aterogénico de estas LDL no es grande, ya que hay un cambio de las LDL pequeñas y densas a una conformación de mayor tamaño y menor poder aterogénico.⁶¹ Además el riesgo potencial asociado es compensado por la reducción de triglicéridos que afecta la transferencia de esteres de colesterol mediada por proteínas, reflejándose en un incremento (generalmente pequeño) del colesterol HDL y la concentración de Apo-AI.³⁷

El cambio en la expresión de HDL no fue significativo en nuestra población, sin embargo existió una tendencia a la disminución similar a la encontrada por Gunnarsdottir y cols en el 2008, donde observaron una disminución en el colesterol HDL en individuos obesos de 20 a 40 años bajo un régimen de pérdida de peso <30%de calorías de grasa divididos en 4 grupos (solo dieta y capsulas de aceite de girasol como control; dieta con proteína de pescado magra; dieta con pescados grasos; dieta con aceite de pescado). La disminución del HDL fue menor en el grupo que consumió pescados grasos o aceite de pescados³⁷. No fue posible determinar si la pérdida de peso fue responsable de la disminución del HDL y el consumo de AGPI aminoró esta respuesta.

Elovl5, ¿marcador molecular o blanco terapéutico?

Biológicamente, es difícil lograr una regulación positiva de Elovl5 con el consumo de AGPI de cadena muy larga (>20 Carbonos), ya que estos inhiben la expresión de Elovl5 de forma sustrato-producto⁶²; sin embargo los efectos adversos ocurridos por la inhibición de Elovl5 (estados crónicos de hiperinsulinemia), son corregidos tras la administración de DHA.⁵⁷ Elovl5 modifica el metabolismo

hepático de carbohidratos y la composición lipídica de los tejidos (longitud de la cadena de ácidos grasos), sin embargo, no se han reportado asociaciones entre la expresión del mRNA de Elovl5 y los niveles de colesterol total y otros lípidos sanguíneos. La participación de Elovl5 en la regulación de SREBP1c podría explicar indirectamente esta vía.⁵⁷ Ya que la proteína SREBP1c participa el metabolismo y síntesis del colesterol.

La disminución de la expresión de Elovl5 en células sanguíneas mononucleares no se asoció a variaciones en la glucemia, de acuerdo con lo reportado en modelos hepáticos animales; en los cuales la disminución de la expresión de Elovl5 mediada por la administración de una dieta alta en grasa, lleva a un estado de hiperglucemia⁶³

Sería interesante saber si la modulación de Elovl5 al administrar AGPI n-3 pudiera evitar la inhibición sustrato producto y verificar de forma más clara que eventos se desencadenan tras la variación de su expresión. Un ejemplo es la modulación de la composición de los lípidos totales en sangre o la variación de la composición de los triglicéridos del tejido adiposo subcutáneo.

Al analizar los datos por género, se observó que las mujeres tuvieron menor expresión de Elovl5 en tejido adiposo, y elovl5 se asoció también a indicadores de la composición corporal, lo cual no había sido descrito anteriormente.

12. Conclusiones

Los AGPI n-3 disminuyen los triglicéridos en los pacientes obesos de 10 a 16 años estudiados, sin embargo para su prescripción se recomienda vigilar los niveles de colesterol LDL.

Existió una relación entre la expresión de Elov15 y las concentraciones de colesterol total y HDL que la coloca como un posible blanco terapéutico en la modulación del metabolismo de lípidos.

13. Perspectivas

Es importante incrementar el tamaño de la muestra para poder extrapolar los resultados a la población pediátrica de la Ciudad de México o el país, además evitar la reducción de la muestra por el faltante de datos, es importante verificar la calidad de los datos para obtener un análisis certero.

Los estudios de expresión génica pueden complementarse de la observación de las proteínas, actividad enzimática y medición de sustratos y productos para tener resultados más confiables.

Este trabajo muestra que Elov15 se encuentra relacionada con el metabolismo del colesterol, por lo cual los estudios posteriores pudieran verificar su efecto en cultivos celulares o modelos animales.

14. Referencias bibliográficas

-
- ¹ Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):911-919
- ² Formiguera X, Cantón A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2004;118(6):1125-1146
- ³ Selassie M, Sinha AC. The epidemiology and etiology of obesity. A global challenge. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* 2011;25:1-9
- ⁴ Allcock DM, Gardner MJ, Sowers JR. Relation between Childhood Obesity and Adult Cardiovascular Risk. *International Journal of Pediatric Endocrinology, Online* 2009. doi:10.1155/2009/108187
- ⁵ Organización Mundial de la Salud (OMS). Factsheet 311. Obesity and overweight. Actualizado en Marzo 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- ⁶ CDC/NCHS (2000). CDC growth charts: United States. <http://www.cdc.gov/growth%20charts>.
- ⁷ Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. México, Cuernavaca. 2006. pp: 94-97.
- ⁸ Reilly JJ. Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005;19(3):327-341
- ⁹ Lee YS. Consequences of childhood obesity. *Ann Acad Med Singapore.* 2009;38(1):75-77.
- ¹⁰ Mahoney LT, Burns TL, SAtanford W. Coronary risk factors measured in childhood and young adult life are associated with coronary artery calcification in young adults. *The Muscatine Study. J Am Coll Cardiol.* 1996;27: 277-284.
- ¹¹ Cuttler L, Whittaker JL, Kodish ED. The overweight adolescent: clinical and ethical issues in intensive treatments for pediatric obesity. *The Journal of Pediatrics.* 2005;146(4):559-564
- ¹² Kirk S, Scott BJ, Daniels SR. Pediatric obesity epidemic: Treatment options. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:S44-S51
- ¹³ Davidson MH. Mechanisms for hypotriglyceridemic effect of marine omega fatty acid. *Am J Cardiol* 2006;98[Suppl]:27i-33i.
- ¹⁴ Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. n₃ polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signalling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E664 –71.
- ¹⁵ Qin Y, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb H. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α -SREBP1c. *BiochimicaetBiophysicaActa.* 2009;1791:140-147

-
- ¹⁶Velliquette RA, Gillier PJ, Kris-Ehthernon PM, Green JW, Zhao G, VandenHeuvel JP. Regulation of human stearoyl-CoA desaturase by omega-3 and omega-6 fatty acids: Implications for the dietary management of elevated serum triglycerides. *J Clin Lip* 2009;3:281-288
- ¹⁷Singhal V, Schwenk F, Kumar S. Evaluation and management of childhood and adolescent obesity. *Mayo Cli Proc.* 2007;82(10):1258-1264
- ¹⁸Ganahan S. Child and adolescent obesity. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2004;34:6-43
- ¹⁹Wang Y. Child Obesity and Health. *International Encyclopedia of Public Health*, 2008: 590-604
- ²⁰Schwarzenberg SJ., Sinaiko AR., Obesity and inflammation in children. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2006;7:239-246
- ²¹Gilsanz V, Chung SA, Jackson H, Dorey FJ., Hu HH. Functional brown adipose tissue is related to muscle volume in children and adolescents. *The Journal of Pediatrics.* 2011;158(5):722-726
- ²²Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.*2007;131:242–256
- ²³Vásquez-Vela MEF., Torres N., Tovar A., White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* 39 (2008) 715e728
- ²⁴Huang YS, Pereira SL, Leonard AE. Enzymes for ransgenic biosynthesis of long chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie.* 2004;86:793-798
- ²⁵Fetterman JW, Zdanowicz MM. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm.* 2009;66(1):1169-1179
- ²⁶Adkins Y, Lekkey Ds. Mechanism underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J NutrBioch.* 2010. In press
- ²⁷Monograph. Docosahexanoic acid (DHA). *Alternative Medicine Review.* 2009;14(4):391-399
- ²⁸Allayee H, Roth N, Hadis HN. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease. Implications for nutrigenetics. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2009;2:140-148
- ²⁹Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M and Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Science.* 2009; 116:1-16
- ³⁰Gil-Campor M, Serrano JD, Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. *AnPediatr (Barc).* 2010;73(3):142.e1-142.e8
- ³¹Connor WE in Nasiff-Hadad A, Meriño-Ibarra E. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. *Lo bueno y lo malo. Rev Cubana Med.* 2003;42(2):49-55

-
- ³² Barceló-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids. Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lip Res.* 2009;48:356-374
- ³³ Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(suppl):1467S-76S.
- ³⁴ Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002;106:2747-2757
- ³⁵ Anderson BM, Ma DWL. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal. *Lip in Health and Disease.* 2009;8:33
- ³⁶ Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(5 Suppl):1645S-1654S.
- ³⁷ Carpentier YA, Portois L, Malaise WJ. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(suppl):1499S-1504S
- ³⁸ Torrejon C, Jung UJ, Deckelbaum RJ. n-3 fatty acids and cardiovascular disease: actions and molecular mechanism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2007(77):319-326
- ³⁹ Massaro M, Scoditi E, Carlocio MA, De Caerina R. Basic mechanism behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2008 (74): 109:115
- ⁴⁰ Caballero R, Gómez R, Nuñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol.* 2006;6(Suppl):3D-19D
- ⁴¹ Harris WS et al. Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia in Lee JH et al. Omega-3 fatty acids and cardioprotection. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(3):324-332.
- ⁴² Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ; AHA Nutrition Committee. American Heart Association. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):151-2.
- ⁴³ Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002).
- ⁴⁴ Dobrzyn A, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73:35-41
- ⁴⁵ Nakamura MT, Nara Y. Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 9$ desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:345-376

-
- ⁴⁶ Flowers M, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791: 85–91
- ⁴⁷ Jiang Z, Michal JJ, Tobey DJ, Daniels TF, Rule DC, MacNeil MD. Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. *Int. J. Biol. Sci.* 2008; 4:345-351
- ⁴⁸ Lochsen T, Ormstad H, Braud H, Brodal B, Christiansen EN, Osmundsen H. Effects of fish oil and n-3 fatty acids on the regulation of Δ^9 -fatty acid desaturase mRNA and –activity in rat liver. *Nutritional Biochemistry* 1997.8:408-413
- ⁴⁹ Ntambi y Thiede citados en: Nakamura MT, Mara TY. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(6):1076-1079
- ⁵⁰ Howell G 3rd, Deng X, Yellaturu C, Park EA, Wilcox HG, Raghow R, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXR alpha. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(12):1190-6.
- ⁵¹ Popeijus HE, Saris WHM, Mensik RP. Role of stearoyl-CoA desaturases in obesity and the metabolic syndrome. *Int J Ob*. 2008;32:1076-1082
- ⁵² Yao-Borengasser a, Rassouli N, Varma V, Bodies AM, Rasouli N, Unal R, et al. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increase after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor γ responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008, 93(11):4431–4439
- ⁵³ Peter A, Weigert C, Staiger H, Rittig K, Cegan A, Lutz P, et al .Induction of stearoyl-CoA desaturase protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295: E339–E349
- ⁵⁴ Wang J, Yu L, Schmidt Re, Su C, Huang X, Gould K, et al. Characterization of HSCD5 a novel human stearoyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochemical and biophysical Research Communications*. 2005;332:735-742
- ⁵⁵ Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R and Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction*. 2007;22(12):3069-3077
- ⁵⁶ AJ L, Corl BA. Identification and characterization of a novel bovine stearoyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5. *Lipids* 2007;499-508
- ⁵⁷ Moon YA, Hammer RE, Horton JD. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res*. 2009;50(3):412-23

-
- ⁵⁸ Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu U, Jump DB. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lip Res.* 2005;46:706-715
- ⁵⁹ Wang, Y., D. Botolin, J. Xu, B. Christian, E. Mitchell, B. Jayaprakasam, M. Nair, J. M. Peters, J. Busik, L. K. Olson, and D. B. Jump. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* 2006. 47: 2028–2041.
- ⁶⁰Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, et al. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine.* Online
- ⁶¹ Bays H. revisado en: Koski RR. Omega-3-acid Ethyl Esters (Lovaza) for severe hypertriglyceridemia. *Drug Forecast.* 2008;33(5):271-303
- ⁶²Kaur G, Cameron-Smith D, Garg M, Sinclair AJ. Docosapentaenoic acid 822:5n-3): A review of its biological effects. *Prog Lipid Res* 82010). Doi:10.1016/jplipres.2010.07.004
- ⁶³Tripathy S, Torres-González M, Jump DB. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 (Elovl5) activity corrects dietary fat induced hyperglycemia in obese C57BL/6J mice. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2642-2654

ANEXOS

DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS UTILIZADAS. PCR EN TIEMPO REAL.

Resultados obtenidos con ProbeFinder versión 2.45 para humanos. Universal ProbeLibrary. Roche applied systems.

SCD1

NM_005063.4 Homo sapiens stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD), mRNA

Assay rank 1

Use probe #82 (cat. no. 04689054001)

| Primer | Length | Position | Tm | %GC | Sequence |
|---|--------|-------------|----|-----|-------------------------|
| Left | 23 | 1102 - 1124 | 60 | 48 | cctagaagctgagaaactggtga |
| Right | 20 | 1147 - 1166 | 60 | 50 | acatcatcagcaagccaggt |
| Amplicon (65 nt) | | | | | |
| cctagaagctgagaaactggtgatgttccagaggaggtactacaaacctggcttgctgatgatgt | | | | | |

SCD 5

NM_001037582.2 Homo sapiens stearyl-CoA desaturase 5 (SCD5), transcript variant 1, mRNA

Use probe #37 (cat. no. 04687957001)

| Primer | Length | Position | Tm | %GC | Sequence |
|---|--------|-----------|----|-----|-----------------------|
| Left | 20 | 872 - 891 | 60 | 55 | ggtccggatccagagaaaagt |
| Right | 21 | 950 - 970 | 59 | 57 | cacagactctctcccagatg |
| Amplicon (99 nt) | | | | | |
| ggtccggatccagagaaaagtactataaagatctccgtggtgctcatgtgctttgtggtccccaogctggtgccctggtacatctggggagagagtctgtg | | | | | |

ELOVL 5

ENST00000304434.6|ENSG00000012660.8 ELOVL5-201 Elongation of very long chain fatty acids protein 5 (hELO1) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9NYP7]

Use probe #31 (cat. no. 04687647001)

| Primer | Length | Position | Tm | %GC | Sequence |
|---|--------|-----------|----|-----|-----------------------|
| Left | 18 | 766 - 783 | 60 | 56 | ccottccatgcggtocata |
| Right | 22 | 820 - 841 | 59 | 45 | gattgtcagcacaactgaagc |
| Amplicon (76 nt) | | | | | |
| ccottccatgcggtocataacctctggtggaagaagtacatcactcagggcagctgottcagtttgtgctgacaatc | | | | | |

ELOVL6

ENST00000394607.3|ENSG00000170522.4 ELOVL6-001 Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (hELO2)(Fatty acyl-CoA elongase)(Long-chain fatty-acyl elongase) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q9H5J4]

Use probe #54 (cat. no. 04688511001)

| Primer | Length | Position | Tm | %GC | Sequence |
|--|--------|-----------|----|-----|-------------------------|
| Left | 23 | 333 - 355 | 59 | 39 | tttgaactgaggaagccattagt |
| Right | 20 | 389 - 408 | 60 | 50 | cagttcgaagagcaccgaat |
| Amplicon (76 nt) | | | | | |
| tttgaactgaggaagccattagtgtctctgtctctgaccottgcagttcttcagttatattcggtgctcttcgaactg | | | | | |