



Universidad
Nacional
de Córdoba



FCM
Facultad de
Ciencias Médicas



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE LA LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

**EFFECTO DE LA DIETA EN LOS PARÁMETROS
MORFOMÉTRICOS, LA RESPUESTA METABÓLICA Y
LAS REPERCUSIONES HISTOLÓGICAS DE UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO KNOCKOUT
PARA TLR 2.**

Alumnos:

Asef Barraza Matías Nahuel – 33752215

Fernández Natalia Yohana – 35571216

Fernández Muñoz Lucía – 36988451

Directora: Dra. Cano Roxana C.

Co-directora: Dra. Defagó Daniela

-Agosto 2016-

HOJA DE APROBACIÓN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE LA LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

Autores:

Asef Barraza, Matías Nahuel

Fernández, Natalia Yohana

Fernández Muñoz, Lucía

Directora:

Dra. Cano, Roxana Carolina

Co-directora:

Dra. Defagó, María Daniela

Tribunal:

Méd. Bollati, Alicia

Méd Quinteros, Carlos

Dra. Defagó, María Daniela

Calificación:

“Las opiniones expresadas por los autores de este Seminario Final no representan necesariamente los criterios de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Médicas.”

Córdoba, 19 de Agosto, 2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos agradecer muy especialmente a todas las personas que de una u otra manera han contribuido con la realización del presente trabajo.

En primer lugar, a nuestras familias por su paciencia, amor y apoyo incondicional. Por constituir el marco en el cuál desarrollamos valores fundamentales, que son los que hoy nos definen como personas en nuestro sentir, pensar y actuar.

También queremos agradecer a la Med. Alicia Bollati, quién desde un primer momento manifestó la mayor predisposición para colaborar con nosotros, conformando el puente inter-institucional que nos permitió vincularnos con la Dra. Roxana Cano docente e investigadora de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba.

De igual modo, agradecemos a nuestra Co-Directora, la Dra. Daniela Defagó, quién con suma dedicación nos acompañó durante todo éste proceso aportándole mayor especificidad a nuestro trabajo mediante el enfoque nutricional basado en su amplia experiencia.

Por último, difícilmente podamos en un solo párrafo expresar la gratitud que sentimos hacia nuestra Directora, la Dra. Roxana Cano, cuyo apoyo, contención y aliento constante representaron una fuente de gran inspiración. Sin dudas, haber tenido la fortuna trabajar junto a ella no sólo resultó muy enriquecedor a nivel académico sino también a nivel personal al transmitirnos incontables valores como humildad, perseverancia, responsabilidad, esfuerzo, y sobre todas las cosas enseñarnos la importancia de amar lo que uno hace.

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	8
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MARCO TEÓRICO.....	9
SISTEMA INMUNE	9
ÁCIDOS GRASOS	12
FRUCTOSA	14
ESTREPTOZOTOCINA	15
SÍNDROME METABÓLICO	16
OBESIDAD COMO PROCESO INFLAMATORIO.....	17
HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	23
DISEÑO METODOLÓGICO	24
TIPO DE ESTUDIO:.....	24
UNIVERSO:	24
MUESTRA:	24
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	26
TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	30
PLAN DE TRATAMIENTO DE LOS DATOS	33
RESULTADOS.....	34
PERFIL LIPÍDICO DE LA DIETA	34
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.....	36
PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.....	39
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	41
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	64
GLOSARIO.....	69

EFFECTO DE LA DIETA EN LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS, LA RESPUESTA METABÓLICA Y LAS REPERCUSIONES HISTOLÓGICAS DE UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO KNOCKOUT PARA TLR 2.

RESUMEN

Área: Investigación Básica

Autores: Asef Barraza MN, Fernández NY, Fernández Muñoz L, Defagó MD, Cano RC.

Introducción: en la obesidad el exceso de tejido adiposo (TA) genera una respuesta inflamatoria sistémica de grado bajo (ISGB) con aumento en la secreción de moléculas inflamatorias, proceso exacerbado por un incremento en la activación de receptores de tipo toll (TLRs) mediante la interacción con ligandos endógenos. Mediadores especializados, como los ácidos grasos poli-insaturados omega 3 (AGPI ω 3) participan en la resolución de la inflamación.

Objetivo: determinar el efecto de una dieta experimental sobre parámetros morfométricos, histología hepática y cardíaca y respuesta metabólica en ratones TLR2-KO.

Diseño Metodológico: se trabajó con una población de ratones C57BL/6 machos TLR2-KO divididos aleatoriamente en dos grupos según dieta: control (DC) y experimental (DE). La DC consistió en alimento estándar rata/ratón con 3% de grasas y la DE alimento balanceado para perros cachorros, 11% de grasas y fructosa al 5% en el agua de bebida. Ambas dietas se analizaron por cromatografía gaseosa para determinar el perfil de ácidos grasos.

Resultados: la DC presentó casi el 50% de ácidos grasos saturados (AGS) y menos de un 2% de AGPI. La DE contuvo 30% tanto de AGS como de AGPI. El grupo de animales alimentados con DE desarrolló obesidad central con depósito incrementado de TA visceral, sin disfunción de adipocitos ni injuria hepática y cardíaca. Metabólicamente mostraron dislipemia mixta sin progresión a diabetes tipo 2 compatible con síndrome metabólico.

Conclusión: se destaca la importancia de la calidad de la dieta en esta población genéticamente homogénea, resaltando que el consumo adecuado de AGPI y una relación ω 6: ω 3 óptima sería una estrategia fundamental para favorecer la resolución de la ISGB.

Palabras Claves: Obesidad- Inflamación- Dieta- AGPI ω 3- TLRs

INTRODUCCIÓN

La obesidad afecta a más del 20% de la población adulta en Argentina¹ y se considera una epidemia creciente a nivel mundial. En la obesidad, el exceso de tejido adiposo genera una respuesta inflamatoria sistémica de grado bajo (ISGB), caracterizada por un incremento en la secreción de moléculas inflamatorias, entre ellas, la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL6) y la resistina; y una disminución en la secreción de la adiponectina. Este desbalance a favor de citocinas pro-inflamatorias puede desencadenar insulino-resistencia en tejidos periféricos² y conducir a una disfunción metabólica responsable de la aparición de patologías como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), aterosclerosis y cardiopatía isquémica.³

Los receptores tipo Toll (TLRs), constituyen una familia de receptores de transmembrana, evolutivamente conservados. Son un tipo de receptores que reconocen patrones moleculares (PRR) y juegan un rol primordial en la respuesta inmune innata tras la interacción con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o patrones moleculares asociados a daño endógeno (DAMPs).⁴

La interacción de los TLRs con diferentes ligandos induce la activación del factor nuclear FN- κ B, un regulador clave de la respuesta inflamatoria, desencadenando diferentes vías de señalización que culminan en la expresión de citocinas pro- inflamatorias y quimiocinas.⁵

Tradicionalmente, se ha postulado a los ácidos grasos saturados provenientes de la dieta o generados en la respuesta metabólica como ligandos de TLR4, posteriormente han sido sugeridos como posibles ligandos de TLR2.^{6,7} Estos hallazgos sugieren que la activación de los TLRs puede ser modulada por componentes de la dieta y sus metabolitos, tendiendo un puente entre la respuesta inmune y la homeostasis metabólica.^{8, 9} Además diversos estudios han demostrado que ratones deficientes en TLR4 y TLR2 estuvieron protegidos contra la inflamación y la insulino-resistencia inducida por una dieta rica en grasas saturadas.^{9, 2}

Por otro lado, recientes investigaciones han destacado la importancia de los ácidos grasos poli-insaturados $\omega 3$ como mediadores especializados en la resolución de la ISGB, mejorando las características del síndrome metabólico (SM) y pudiendo tener potenciales propiedades preventivas contra las comorbilidades asociadas a la obesidad.¹⁰

Nuestro laboratorio desarrolló un modelo experimental de obesidad *in vivo* en ratones C57BL/6 alimentados con dieta moderada en grasa y fructosa (11% y 5% respectivamente) e inyección intraperitoneal de una dosis mínima de estreptozotocina (STZ).¹¹ Lo interesante de ésta propuesta es que difiere de otros modelos metabólicos artificiales extremos que emplean dietas con 42%⁸ o 50% de grasa,¹² que si bien aportan datos valiosos, su utilidad para explicar las alteraciones metabólicas inducidas por las formas de obesidad no extremas que dominan el campo clínico, resulta limitada.¹³

Los antecedentes citados nos motivan a estudiar la influencia de la dieta antes mencionada sobre el desarrollo de obesidad experimental y patologías inflamatorias asociadas en ratones C57BL/6 knockout para TLR2 (TLR2-KO) y confrontar los resultados obtenidos con datos hallados previamente en nuestro laboratorio, en ratones wild type (WT) de la misma base genética, tratados con una dieta similar.

El campo de estudio en relación a las múltiples interacciones entre alimentación, metabolismo e inmunidad resulta un área emergente de gran interés y en continuo desarrollo. La posibilidad de modular diferencialmente la respuesta inmunometabólica del organismo relacionada a la ISGB a través de los componentes de la dieta constituye un aspecto sumamente atractivo que reivindica la importancia de la calidad de la alimentación en torno a la aparición, desarrollo y progresión de alteraciones metabólicas que constituyen el denominador común de gran parte de las patologías crónicas más prevalentes actualmente, generadoras de grandes costos sociales, económicos y sanitarios.

Este estudio, al igual que otros disponibles en este campo de investigación, pretende sumar información que contribuya a futuro al desarrollo de estrategias tanto preventivas como terapéuticas para el abordaje de la obesidad y sus co-morbididades.

PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es el impacto de la dieta en el desarrollo de alteraciones morfométricas, histológicas y metabólicas en ratones TLR2-KO sometidos a una dieta experimental en la ciudad de Córdoba en el período 2015-2016?

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de una dieta experimental sobre los parámetros morfométricos, la histología hepática y cardíaca y la respuesta metabólica en ratones machos C57BL/6 TLR2-KO tratados con estreptozotocina.

Objetivos específicos

1. Analizar el perfil de ácidos grasos de la dieta control y la dieta experimental mediante análisis por cromatografía gaseosa.
2. Determinar parámetros morfométricos (peso corporal, circunferencia de cintura, peso del tejido adiposo visceral) a través del pesaje y medición de los animales.
3. Examinar la histología hepática y cardíaca en cortes de tejido coloreados con hematoxilina-eosina.
4. Determinar enzimas hepáticas, glucemia, colesterol total y triglicéridos a través de test enzimáticos y apolipoproteína B100 por inmunoturbidimetría.
5. Evaluar la relación entre la dieta experimental administrada y los diferentes parámetros estudiados.

MARCO TEÓRICO

SISTEMA INMUNE

El sistema inmunitario es un sistema de defensa que mantiene la homeostasis del individuo frente a cualquier tipo de agresión (externa o interna). Existen dos grandes tipos de inmunidad: innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica).¹⁴

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo y se caracteriza por ser constitucional e independiente de la experiencia antigénica previa del individuo. Los elementos que la constituyen se caracterizan por estar preformados o ser rápidamente inducibles por estímulos patogénicos.^{14,15} Por otro lado, los mecanismos de defensa más especializados, son aquellos que constituyen la inmunidad adaptativa, éstos se encuentran sólo en los vertebrados.^{14,15,16} Las características que definen la inmunidad adaptativa son la especificidad frente a moléculas diferentes y una capacidad de memoria que le permite responder de forma más eficaz a exposiciones repetidas al mismo microorganismo ya que se optimizan a través de sucesivos contactos con agentes patogénicos.¹⁵

Si bien cada tipo de inmunidad tiene un momento de respuesta y una función determinada, ambas actúan de forma interconectada para potenciarse mutuamente.¹⁴⁻¹⁶

Receptores innatos reconocedores de patrones moleculares

Comprenden un grupo de receptores celulares y solubles del sistema inmunitario innato o inespecífico que reconocen estructuras moleculares compartidas por diferentes tipos de agentes patógenos denominadas PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y moléculas propias derivadas del daño celular, definidas como DAMPs (*Damage Associated Molecule Patterns*).

Estos receptores se engloban bajo el nombre de receptores de reconocimiento de patrones o PRR (*Pattern Recognition Receptors*) y la unión

a sus respectivos ligandos desencadena tanto la respuesta inicial del sistema inmunitario contra agentes infecciosos, como el inicio de procesos de reparación tisular tras una injuria. A diferencia de los receptores específicos de antígeno (receptores de linfocitos T y receptores de linfocitos B), estos PRR no requieren el reordenamiento de sus genes (están codificados por genes dispuestos tal y como están en la línea germinal), son poco o nada polimórficos y no tienen una distribución clonal. Además, la expresión de los PRR no está restringida a los leucocitos, y pueden expresarse en otros tipos celulares no hematopoyéticos, como las células epiteliales o endoteliales.

En mamíferos se han identificado varias clases de PRRs, tales como: RIG-I-like receptors (RLRs), Nod-like receptors (NLRs), y sensores intracelulares de ADN. Sin embargo, actualmente se destacan por su importancia funcional y terapéutica, los receptores tipo Toll o TLRs (Toll-Like Receptors) siendo los mejor caracterizados estructural y funcionalmente.^{5, 14}

Receptores tipo Toll

Los TLRs son una familia de receptores de transmembrana altamente conservados que fueron descritos originalmente en *Drosophila melanogaster* como moléculas implicadas en el desarrollo dorsoventral de la mosca de la fruta.^{15,16} Posteriormente se observó que la proteína toll protegía a la mosca adulta de las infecciones por hongos mediante la estimulación de la secreción de péptidos antifúngicos. Años más tarde, se identificaron en humanos, una serie de proteínas con homología a la proteína toll de *Drosophila* que recibieron el nombre de “Receptores tipo Toll” y se demostró que éstas eran capaces de inducir la producción de citocinas inflamatorias y la expresión de moléculas co-estimuladoras.⁴

Localización, estructura y vías de señalización de los TLRs

Actualmente se reconocen 10 miembros de la familia de TLRs en humanos (TLR1 - TLR10) y 12 en ratones (TLR1 - TLR9 y TLR11- TLR13).⁵ Los TLRs son expresados en células centinelas tales como células dendríticas y macrófagos (M ϕ), las cuales conducen la respuesta inmune innata y en otros

tipos celulares. Entre ellos, células epiteliales, fibroblastos, mioblastos^{2, 12} y adipocitos.²

La estructura de estos receptores se caracteriza por presentar tres dominios: el dominio extracelular, región rica en leucina, en forma de herradura; el dominio transmembrana; y un dominio intracelular llamado TIR (receptor de interleucina 1).^{5, 12,15 18} (Ver figura 1 en anexos)

Tras el reconocimiento de diferentes PAMPs o DAMPs, la señalización intracelular mediada por TLRs es iniciada por interacciones heterofílicas dependientes del dominio TIR con proteínas adaptadoras citosólicas que presentan dicho dominio tales como: MyD88 (Factor de Diferenciación Mieloide 88), TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR inductor de IFN- β), TIRAP/MAL y TRAM (molécula adaptadora relacionada con TRIF).⁴ (ver figura N° 2) Diferentes TLRs utilizan distintas moléculas adaptadoras para inducir la producción de citocinas, sin embargo, MyD88 es el adaptador utilizado por la mayoría. Éste, a través de reacciones en cascada, promueve la activación de quinasas, que en última instancia, activan al FN- κ B y la producción de citocinas pro-inflamatorias, IL-1, IL-6, IL-8 Y TNF- α .^{4, 5} (Ver figura 2 en anexos)

Receptor tipo Toll 2

El TLR2 se expresa fundamentalmente en células del sistema inmune innato, aunque también se encuentra en diversas células tales como adipocitos, miocitos, hepatocitos¹⁹ y cardio-miocitos.²⁰

TLR2 reconoce una variedad de componentes microbianos, entre ellos, lipopéptidos bacterianos, pectidoglicanos y ácidos lipoteicoicos, y forma un heterodímero con TLR1 o TLR6 para discriminar sus ligandos. Los complejos TLR2- TLR1 y TLR2-TLR6 reconocen lipopéptidos triacetilados y lipopéptidos diacetilados, respectivamente, lo que sugiere que las cadenas de AG pueden ser críticas para la discriminación ligando dependiente por TLR2.³ La dimerización inducida por ligandos de TLR2, ya sea con TLR1 o TLR6 desencadena el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88.¹⁹

ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos (AGs) son moléculas orgánicas, constituidas por una cadena hidrocarbonada de tipo lineal con un grupo carboxílico, en general con número par de átomos de carbono cuya longitud puede variar entre 4 y 26 carbonos, siendo más abundantes los de 16 y 18 carbonos, ácido palmítico y esteárico respectivamente.

Según la cantidad de dobles enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada pueden ser clasificados como saturados o insaturados. Los ácidos grasos saturados (AGS) no presentan dobles enlaces, mientras que los ácidos grasos insaturados (AGI) contienen uno o más dobles enlaces en su estructura química, asimismo estos se clasifican en ácidos grasos mono-insaturados (AGMI) o ácidos grasos poli-insaturados (AGPI).²¹

Los AGS se encuentran principalmente en grasas de origen animal y se ha asociado su elevada ingesta a un mayor riesgo cardiometabólico.²² Tales AGs poseen un efecto pro-inflamatorio bien caracterizado, debido en parte, a su papel como ligando del receptor TLR4.²³ Por tanto una disminución de este tipo de AGs fue considerada tradicionalmente como una estrategia válida para reducir el riesgo cardiometabólico, sin embargo recientes estudios sugieren que el riesgo asociado a los AGs depende del nutriente con el cual se realiza la comparación, el subtipo de AG y su fuente alimentaria.²⁴

Los ácidos grasos esenciales (AGE) son aquellos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo, por lo tanto deben ser obtenidos de fuentes externas ya que son requeridos por el organismo para cumplir importantes procesos fisiológicos. Los AGE en el ser humano son el ácido alfa-linolénico (AAL) perteneciente a la serie de AGPI omega 3(ω 3), presente en harina y aceite de linasa y el ácido linoleico (AL) a la serie AGPI ω 6, que se encuentra en aceites vegetales (girasol, maíz y soja). Ambos AGPI son los precursores de las principales moléculas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias respectivamente. Por un lado, a partir del AL se sintetiza el

ácido araquidónico (AA) parcialmente indispensable y precursor de prostaglandinas, tromboxanos, y prostaciclina, todos ellos, mediadores pro-inflamatorios. Por otro lado el AAL es el precursor de las principales moléculas anti-inflamatorias, ácido eicosapentaenoico (EPA) y del ácido docosahexaenoico (DHA) que dan lugar a tres familias de mediadores locales que facilitan la resolución de la inflamación: resolvinas D1, D2 y E; protectinas y maresinas.^{10, 25} Ambos son encontrados en cantidades considerables en pescados y aceites de pescados grasos (atún, caballa, salmón, anchoas y sardinas).¹⁰

Existe una relación de competencia entre sustratos (AGPI ω 3 con AGPI ω 6) por enzimas claves de sus vías metabólicas (ciclooxigenasa y lipooxigenasa) para formar las diferentes clases de eicosanoides. Es preciso destacar que, tales enzimas presentan mayor afinidad por los AGPI ω 3. Por este motivo, clásicamente se ha postulado una relación óptima de ω 6: ω 3 de 6:1.²¹ Actualmente el patrón alimentario occidental presenta una relación ω 6: ω 3 15-20:1, la cual está asociada con la ocurrencia de múltiples trastornos metabólicos e inflamatorios.^{10, 26}

Estudios en humanos han observado que un excesivo aporte dietario de ω 6, con el consecuente desequilibrio en la relación ω 6: ω 3, se asocia positivamente a concentraciones plasmáticas desfavorables de biomarcadores inflamatorios y alteraciones en el metabolismo de la glucosa.²⁷ Por otro lado, estudios epidemiológicos han señalado una menor prevalencia de enfermedades cardiovasculares y DM2 en personas con alto consumo habitual de AGPI ω 3, como así también una disminución significativa en la intolerancia a la glucosa comparado con aquellos sujetos que no consumen alimentos fuente de estos ácidos grasos.²⁸ Por este motivo, recientemente algunos autores han propuesto una relación más equilibrada ω 6: ω 3 de 2:1 como estrategia preventiva de estos trastornos metabólicos.²⁹

FRUCTOSA

La fructosa es una cetohexosa que se encuentra presente en diversos alimentos. Junto con glucosa forma el disacárido sacarosa, principal edulcorante energético utilizado en el mundo³⁰ en la miel se encuentra como monosacárido y en frutas y vegetales está presente en ambas formas como mono y disacárido.³¹

A pesar de algunos efectos positivos de la fructosa tales como su mayor poder edulcorante respecto a glucosa, su alto efecto termogénico, y su bajo índice glucémico, una alta ingesta de fructosa puede conducir a alteraciones metabólicas hepáticas en mayor magnitud que un consumo de cantidades equivalentes de glucosa.³²

Luego de su absorción intestinal por difusión facilitada a través de GLUT 5, la fructosa es rápidamente transportada por vena porta hacia el hígado donde es captada de manera muy eficiente por los hepatocitos, llegando a circulación general sólo cantidades muy pequeñas.

Las diferentes alternativas metabólicas que puede seguir la fructosa a nivel hepático son: oxidación, conversión a glucosa, ácido láctico o a AG (lipogénesis de novo). El grado en el cual la fructosa ingresa en esta última vía es crítico respecto a sus efectos sobre la salud.

Una vez dentro del hepatocito la fructosa entra a la vía glicolítica tras sufrir fosforilación por la fructoquinasa dando origen a fructosa-1-fosfato. De este modo la fructosa evita la principal reacción limitante de la vía glicolítica catalizada por la fosfofructoquinasa, enzimas altamente reguladas por el estado energético de la célula.^{21,31} Además la fructoquinasa es una enzima pobremente regulada, por lo cual incluso cuando el estado energético (ATP) del hígado es alto esta enzima podría seguir metabolizando fructosa a fructosa-1-fosfato. Luego de esta fosforilación y a través de sucesivas reacciones la fructosa termina formando las mismas triosas fosfato que se obtienen en la glicolisis.

En síntesis, la fructosa podría ser metabolizada ilimitadamente en el hígado, en oposición con lo que ocurre con la glucosa. Esto podría influenciar el

tipo y cantidad de metabolitos producidos por el hígado y es la principal razón por la cual la fructosa y la glucosa poseen diferentes efectos metabólicos.

El gran potencial que posee la fructosa para estimular la lipogénesis de novo resulta al menos de dos mecanismos, por un lado, ésta puede actuar como una fuente no regulada de acetatos activos; por otro, un alto consumo de fructosa ha sido relacionado con un aumento en la expresión y en la actividad de enzimas lipogénicas hepáticas.

Consecuente a los cambios metabólicos descritos un excesivo consumo de fructosa podría causar potencialmente incremento en la exportación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y posteriormente aumento en los niveles de colesterol en sangre y acumulación de grasa en hígado.³¹

ESTREPTOZOTOCINA

La estreptozotocina (STZ) es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces achromogens* que posee un amplio espectro de propiedades antibacteriales.^{33, 34} Estructuralmente está compuesta por una molécula de desoxi-glucosa que se encuentra unida a una molécula de metil-nitrosourea, responsable de los efectos citotóxicos de la STZ, mientras que el resto glucídico es el encargado de dirigir la molécula a las células β del páncreas.³⁴ (Ver figura 3 en anexos)

La STZ reconoce al receptor GLUT2, abundante en la membrana plasmática de las células β del páncreas, de ahí su especificidad por estas células. Sin embargo, el GLUT2 se encuentra también, en menor grado, en los hepatocitos y las células tubulares; sitios de metabolización y excreción de la STZ respectivamente, por lo tanto, altas dosis de la misma podrían causar daños funcionales en riñón e hígado.³⁴⁻³⁶

Las células β afectadas por la STZ son eliminadas por los M ϕ , generando una reducción en la masa de células β que conduce a una insuficiencia insulínica y posterior hiperglucemia crónica.³⁴ (Ver figura 4 en anexos). Los efectos diabetogénicos de la STZ se reportaron por primera vez

en la década del 60' y desde entonces ha sido el agente de elección para la inducción de DM en una amplia variedad de especies animales, grandes y pequeños.^{36, 37}

Tradicionalmente, la STZ, ha sido utilizada en altas dosis para inducir DM1, generando un daño masivo en las células β pancreáticas. Sin embargo, en los últimos años fue propuesto un nuevo modelo para inducir DM2 usando dosis bajas de STZ junto a una dieta rica en grasas³⁸, ya que fue demostrado que ésta, por si sola, no resultaba efectiva para generar modificaciones metabólicas, a menos que fuera administrada por un período de tiempo prolongado.

De este modo, el aporte graso por un lado, predispone a la aparición de insulino- resistencia periférica y la STZ en bajas dosis, por otro, genera un modesto deterioro en la función de la masa de célula β , sin comprometer totalmente la secreción de insulina, consiguiendo así, desarrollar un fenotipo metabólico similar al observado en la fase crónica de la enfermedad humana.³⁹

SÍNDROME METABÓLICO

En el año 1988 Reaven describió el *Síndrome X*, como la ocurrencia conjunta de insulino-resistencia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, concentraciones bajas de colesterol-HDL e hipertensión,⁴⁰ omitiendo, sorprendentemente, un componente esencial como la obesidad visceral; desde entonces, se han propuesto varias denominaciones de las cuales la más frecuente es la de Síndrome Metabólico.⁴¹

En el año 2009 el Grupo de Trabajo sobre Epidemiología y Prevención de la Federación internacional de Diabetes; el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre de los Estados Unidos; la Asociación Americana del Corazón; la Federación Mundial del Corazón; la Sociedad Internacional aterosclerosis; y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad en un intento por unificar criterios diagnósticos del Síndrome Metabólico, definieron al mismo como una compleja interrelación de factores de riesgo para el desarrollo de DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV) entre los cuales incluyeron: 1) Obesidad Central, definida por incremento de la circunferencia de cintura por

encima de los puntos de corte específicos definidos para cada etnia; 2) Hipertrigliceridemia (150 mg/dL); 3) colesterol-HDL reducido (40 mg/dL en hombres y 50 mg/dL en mujeres); 4) Elevación de la tensión arterial (TAS \geq 130 y/o TAD \geq 85 mm Hg); 5) Alteración de la glucemia en ayunas (100 mg/dL).⁴²

Además, recientemente, varios estudios proponen a la enfermedad de hígado graso no alcohólico o NAFLD, por sus siglas en inglés (*nonalcoholic fatty liver disease*) como la expresión hepática del síndrome metabólico.⁴³

Esta constituye la enfermedad crónica del hígado más frecuente del mundo y comprende un espectro de anormalidades hepáticas observables por histología que van desde una simple acumulación de grasa intra-hepática a varios grados de inflamación necrótica que pueden progresar incluso a hepatocarcinoma.^{43, 44} Por este motivo, identificar esta entidad y tratarla resulta de crucial importancia, más aun, teniendo en cuenta la alta prevalencia actual de obesidad y DM, ambos factores de riesgo para NAFLD⁴³

OBESIDAD COMO PROCESO INFLAMATORIO

La obesidad es un problema de salud epidémico, metabólico, crónico, heterogéneo, resultado de la carga genética y ambiente, caracterizado por un aumento de la grasa corporal, cuya distribución y magnitud condicionan la salud del individuo.⁴⁵ En la actualidad se le da gran importancia a la distribución del tejido adiposo (TA) con relación a las consecuencias fisiopatológicas que se presentan en la obesidad.⁴⁶ Desde el punto de vista anatómico Shen y col. en el año 2003 han realizado una clasificación exhaustiva del TA blanco. Según estos autores, el tejido adiposo subcutáneo (TAS) puede ser superficial o profundo, mientras que el tejido adiposo visceral (TAV) puede estar constituido por grasa mesentérica, omental o epiploica, retroperitoneal y perirrenal.⁴⁷

El TA está constituido en un 50% por adipocitos y el resto por constituyentes vasculares, fibroblastos, células endoteliales, pre-adipocitos y macrófagos (M \emptyset). Los M \emptyset constituyen entre 5 y 10% del total de las células presentes en el TA, pero la ganancia de peso inducida por la dieta genera una infiltración significativa de M \emptyset que contribuye con más del 60% de las células

presentes en este tejido. Los adipocitos pueden producir proteínas bioactivas denominadas adipocinas, las cuales constituyen factores secretorios que incluyen las citocinas, factores de complemento, enzimas, factores de desarrollo y hormonas.⁴⁶

Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación y tejido adiposo visceral

En condiciones de obesidad se ha demostrado que aproximadamente en un 70-80% de los individuos se produce un remodelado del TA tanto a nivel estructural como funcional que provoca una reacción inflamatoria, en principio local, es decir, en el TAV, que, de no ser resuelta, desencadena un estado inflamatorio crónico con repercusiones sistémicas.²⁵

Cuando existe un balance positivo de energía, el excedente energético se acumula como triacilgliceroles en el TAS, el cual crece predominantemente por hiperplasia. Luego, tras sobrepasarse la capacidad adipogénica de dicho tejido, aumentan los depósitos de grasa visceral que crecen fundamentalmente por hipertrofia.²⁵ Esta expansión del TA origina distintos eventos que de manera simultánea concluyen en la inflamación local del TAV.

Por un lado, se producen modificaciones en el espaciamiento de la fracción vascular-estromal del TAV, generando hipoxia y posterior necrosis de los adipocitos localizados en zonas lejanas a los vasos sanguíneos. Por otra parte, la hiperplasia/hipertrofia adipocitaria conlleva a la lipoperoxidación, generando un estallido oxidativo. En consecuencia, se genera un proceso inflamatorio local con el objetivo de remodelar el tejido, eliminando células muertas y retirando su contenido lipídico potencialmente citotóxico como una forma de neutralizar el estallido oxidativo.

La hipoxia y la lipoperoxidación generan condiciones de estrés que provocan alteraciones funcionales en los adipocitos como plegamientos incompletos de proteínas y autofagia, lo cual es capaz de desencadenar apoptosis en estas células, perpetuando el estado inflamatorio.^{46, 48, 49}

Esta inflamación local del TA se caracteriza por la elevada infiltración de células inmunes, (Mø y en menor medida linfocitos T citotóxicos) principales

responsables junto a los adipocitos disfuncionales, de la secreción de factores inflamatorios. Los Mø rodean los adipocitos formando estructuras parecidas a coronas o CLS (*crown like structures*), rasgo distintivo de la inflamación de grado bajo en el tejido adiposo.⁴⁸

El TA hiperplásico e hipertrófico exhibe niveles elevados de IL-1 β , IL-6, TNF- α , y Leptina, así como una producción elevada de quimiocinas tales como proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP1), factor inhibitorio de la migración de Mø (MIF1) y RANTES.⁴⁸ Al mismo tiempo presenta una disminución de adipocinas antiinflamatorias como la IL-10, adiponectina y arginasa. Este desbalance resulta en la inducción de una inflamación excesiva.⁴⁹

Es importante resaltar que los Mø pueden presentar dos fenotipos basados principalmente en el perfil de citocinas que secretan. Los Mø M1 producen citocinas pro-inflamatorias, en contraste los Mø M2 secretan citocinas antiinflamatorias.⁴⁹ En condiciones de sobrealimentación se produce el fenómeno de cambio fenotípico debido a una transformación en el estado de polarización de los Mø, que pasan del estado antiinflamatorio M2 al estado pro-inflamatorio M1.^{25,48, 49} (Ver figura 5 en anexos)

Estos cambios en el TAV, no sólo podrían tener una afeción autócrina y parácrina sino también endocrina, lo cual sugiere que la inflamación del TAV podría desencadenar un proceso de inflamación sistémica de grado bajo que afectaría a otros tejidos insulino-dependientes como el hepático y muscular y perpetuaría el estado inflamatorio a nivel adipocitario.⁴⁸

Inflamación sistémica de grado bajo

La inflamación sistémica de grado bajo (ISGB) presenta diferencias importantes con respecto a la respuesta inflamatoria clásica. Este cuadro se caracteriza por una elevación de los niveles circulantes de proteínas de fase aguda y citocinas con actividad inflamatoria tales como proteína C reactiva (PCR), TNF- α y IL-1 β , IL-6 e IL-17, así como un aumento de la infiltración de células inmunes en tejidos insulino-dependientes, como se mencionó

anteriormente. Además, el tejido no muestra alteraciones estructurales o pérdidas en sus funciones primarias. (Ver tabla 1 en anexos)

Evidencia reciente, tanto experimental como clínica, sugiere a la ISGB como uno de los mecanismos fisiopatológicos clave que relaciona la obesidad con la resistencia a la insulina y la DM2, además de estar íntimamente asociada con el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica y las enfermedades cardiovasculares, entre otras.^{25,48,50}

Papel de los TLRs en el inicio de la inflamación sistémica de grado bajo

Si bien el papel de los TLRs ha sido ampliamente descrito en procesos infecciosos, un cuerpo creciente de evidencia sugiere que estos receptores podrían desempeñar un papel clave durante el inicio y la perpetuación de la ISBG asociada con obesidad. A diferencia de la inflamación aguda o clásica inducida por PAMPs, la respuesta asociada con diferentes moléculas derivadas de un estado metabólico alterado, o DAMPs metabólicos, tal como ocurre en la obesidad, conduce a una inflamación de menor intensidad, mayor duración y sistémica.⁴⁸ Sin embargo, es necesario aclarar que bajos niveles de DAMPs resultan beneficiosos y necesarios durante la reparación tisular para inducir una respuesta inmune fisiológica.³

Tanto la dislipemia como la hiperglucemia pueden inducir una respuesta inflamatoria en el Mø a través de la activación por TLRs luego de su unión con diferentes ligandos. Entre estos se encuentran, AGL, sobre todo AGS como el ácido palmítico así como productos terminales de glicación avanzada y lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidadas, que actúan como ligandos de TLR2 y TLR4 respectivamente.^{48,49}

Estos receptores, como ya se mencionó, favorecen la activación del FN-κB, el cual regula la transcripción de moléculas inflamatorias, principalmente el TNF-α y la IL-6, ambos con gran implicancia en el desarrollo de insulino-resistencia ya que desencadenan defectos en la transducción de señales de insulina.^{46, 48}

Rol de los ω 3 en la resolución de la inflamación sistémica de grado bajo

La resolución de la ISGB es un proceso activo y complejo en el que participan una multitud de moléculas con acción anti-inflamatoria denominadas mediadores especializados en la resolución de la inflamación, dentro de los cuales, aquellos derivados de los AGPI ω 3 cumplen un papel protagonista.²⁵ Numerosos estudios *in vivo* y/o *in vitro* confirman los efectos positivos de los ω 3 en el metabolismo lipídico y glucémico, tales como disminución de TAG, aumento del colesterol-HDL, insulino-sensibilización y reducción de la tensión arterial.^{29, 51}

Los efectos anti-inflamatorios de los ω 3 ocurren por una doble vía: por un lado, la inhibición de la síntesis de mediadores pro-inflamatorios derivados de los ω 6 (PEG2 y LTB4) y por otro, consecuencia de su metabolización se sintetizan potentes mediadores anti-inflamatorios como resolvinas y protectinas. Estos últimos, entre otros efectos, promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos induciendo su polarización fenotípica M2, con acción anti-inflamatoria.^{51, 52}

Varios mecanismos directos o indirectos han sido sugeridos para explicar estos efectos. Uno de los más determinantes es la modificación en el perfil de AGs constituyentes de los fosfolípidos de membrana favorecido por el aumento en la ingesta de ω 3. Esto altera favorablemente procesos de cascada de señalización celular a nivel de transducción de señales, expresión de genes y biosíntesis de eicosanoides, lo que deriva en inhibición de la producción de moléculas pro-inflamatorias (enzimas y citocinas incluyendo COX-2, TNF-alfa, IL-1beta e IL-6.) y estimulación de la síntesis de mediadores anti-inflamatorios. Estos efectos dependen de distintas vías; por un lado la activación de PPAR γ conduce a un incremento de macrófagos M2, y una consecuente normalización del perfil secretor caracterizada por disminución de mediadores pro-inflamatorios y un aumento en la síntesis de adiponectina, responsable de varios efectos anti-inflamatorios a nivel local y sistémico. Por el otro, la inhibición del NF- κ B, en parte, también dependiente de la activación de PPAR γ , conduce a una reducción de la expresión de genes pro-inflamatorios.

Además el receptor acoplado a la proteína G 120 (GPR120) estimulado también por los mediadores derivados del ω 3, bloquea las vías de señalización pro-inflamatorias. (Ver figura 6 en anexos) ^{23,51, 52}

De esta manera la inflamación local disminuye, logrando una normalización de la función del TA. Esto resulta en efectos beneficiosos a nivel sistémico, tales como, restauración de la sensibilidad a la insulina y de la homeostasis de la glucosa, disminución de los depósitos ectópicos de lípidos, normalización del perfil lipídico y disminución de la esteatosis hepática.⁵¹

HIPÓTESIS Y VARIABLES

Hipótesis:

- La ingesta de la dieta experimental (DE) produciría alteraciones fisiopatológicas en los parámetros morfométricos, metabólicos e histológicos en ratones C57BL/6 TLR2 KO con relación a la dieta control (DC), ambos tratados con STZ.

VARIABLES EN ESTUDIO:

Variable Independiente:

- Dieta: Variable cualitativa dicotómica.

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Peso: Variable cuantitativa continua.
- Circunferencia de Cintura: Variable cuantitativa continua.
- Peso de Tejido Adiposo Visceral: Variable cuantitativa continua.
- Histología Hepática: Variable cualitativa dicotómica
- Histología Cardíaca: Variable cualitativa dicotómica
- Actividad de ALT: Variable cuantitativa continua.
- Actividad de AST: Variable cuantitativa continua.
- Glucemia: Variable cuantitativa continua.
- Colesterol Total: Variable cuantitativa continua.
- Triacilglicéridos: Variable cuantitativa continua.
- ApoB-100: Variable cuantitativa continua.

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio:

Se realizó un estudio experimental, longitudinal y prospectivo, ya que se manipuló la variable independiente, y se midió el comportamiento de las variables dependientes en tres momentos diferentes post-intervención (1°, 3°, 6° mes).

Universo:

Ratones C57BL/6 machos TLR2-KO, endocriados de 25- 28 g (2 a 3 meses de edad). Se tomó este peso como requisito para el comienzo del experimento ya que es el momento en que los animales cuentan con la resistencia necesaria para implementar las posteriores técnicas de recolección de datos.

Muestra:

Se trabajó con una población de ratones C57BL/6 machos TLR2-KO con una inyección intraperitoneal de estreptozotocina. Se dividió a la población aleatoriamente en dos grupos: ratones alimentados con dieta control (DC) y ratones intervenidos con dieta experimental (DE), con un número de 4 a 6 animales por grupo. Los ratones fueron provistos por el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

La dosis de estreptozotocina empleada fue única y mínima (8mg por cada kilo de peso). El objetivo de su utilización fue acelerar la progresión a DM2 y poder observar en el lapso que dura el experimento, las alteraciones fisiopatológicas correspondientes evitando así la participación de otras variables no deseadas como consecuencia del envejecimiento de los animales.

Los animales se mantuvieron en ciclos estándares de luz (12hs luz/oscuridad) y con acceso ilimitado de agua y comida (*ad libitum*), en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), siguiendo las recomendaciones de la Guía de Uso y Cuidados

de Animales de Experimentación (Consejo Canadiense de Cuidados de animales) y aprobado por el Comité de Ética de la UCC.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable independiente

• Dieta

Definición Conceptual: Alimentos y bebidas usuales consumidos regularmente.⁵³

Definición operacional: Categorización:

1- Dieta Control: alimento estándar rata/ratón, con una concentración de grasas del 3% (GEPESA®) y agua.

2- Dieta Experimental: alimento balanceado para perros cachorros, (Purina® Dog Chow raza pequeña ®), con una concentración de grasas del 11% y fructosa diluida al 5% en el agua de hidratación de los animales.

La composición porcentual de ambas dietas se detalla a continuación en la tabla I

Tabla 1. Composición porcentual detallada de los nutrientes de ambas dietas: dieta control (DC) y dieta experimental (DE)

Composición porcentual de la dieta	DC GEPESA (rata/ratón)	DE PURINA (Dog chow®)
Proteínas (%)	26	27
Carbohidratos (%)	53	49
Grasas (%)	3	11
Fibras (%)	8	3
Minerales Totales (%)	10	10

El aporte calórico de la DC fue de 343 kcal/100g de alimento, a diferencia de la DE que aportó 403 kcal/100g de alimento, sumado a las 20 kcal/100g de fructosa en solución en el agua de bebida.

Variables dependientes:

• Peso

Definición conceptual: Indicador global de la masa corporal total del animal. Constituye un dato general, pero importante del estado nutricional.⁴⁷

Definición operacional: gramos (g)

• Circunferencia de cintura:

Definición conceptual: Contorno del tronco del animal en su sitio más prominente.

Definición operacional: centímetros (cm)

• Peso Tejido Adiposo Visceral:

Definición conceptual: Compartimento adiposo del animal localizado específicamente por dentro de las paredes óseas y musculares del abdomen, dispuesto alrededor de los diferentes órganos.⁴⁷

Definición operacional: gramos (g)

• Histología Hepática:

Definición conceptual: Observación y estudio de los cortes microscópicos de tejido del órgano hepático.

Definición Operacional: Categorización:

1- Presencia de esteatosis hepática

2- Ausencia de esteatosis hepática

• Histología Cardíaca:

Definición conceptual: Observación y estudio de los cortes microscópicos de tejido del corazón.

Definición operacional: Categorización:

1- Presencia de esteatosis cardíaca

2- Ausencia de esteatosis cardíaca

- **Actividad de Alanino-aminotransferasa (ALT)**

Definición conceptual: transaminasa localizada casi exclusivamente en el citosol del hepatocito con valor clínico para revelar lesión hepática.⁵⁴

Definición operacional: U/L

- **Actividad de Aspartato-aminotransferasa (AST)**

Definición conceptual: transaminasa localizada en hígado, corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos, con valor clínico para revelar daño hepático en menor medida que la ALT.⁵⁴

Definición operacional: U/L

- **Glucemia:**

Definición conceptual: concentración de glucosa en la sangre.⁵⁵

Definición operacional: mg/dL

- **Colesterol total**

Definición conceptual: Suma de las concentraciones de las lipoproteínas encargadas del transporte del colesterol en sangre (fundamentalmente LDL y HDL).⁵³

Definición operacional: mg/dL

- **Triacilglicéridos**

Definición conceptual: compuesto formado por un ácido graso (oleico, palmítico o esteárico) y glicerol. Los triglicéridos se sintetizan a partir de la mayoría de las grasas animales y vegetales y son los principales lípidos de la sangre, en la que circulan, unidos a proteínas, formando las lipoproteínas de alta y baja densidad.⁵⁵

Definición operacional: mg/dL

- **ApoB-100**

Definición conceptual: componente proteico de las lipoproteínas implicadas en el transporte hepático de los lípidos, como la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y la lipoproteína de baja densidad (LDL).⁵⁵

Definición operacional: mg/dL

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Determinación del Perfil de ácidos grasos por Cromatografía de Gas (CG):

Se analizó el perfil de ácidos grasos en muestras de las diferentes dietas. Para realizar la determinación de los lípidos se procedió a:

- 1) Su extracción por el método de Folch, que consiste en el aislamiento y purificación de los lípidos totales de las muestras. Primero los lípidos de las muestras homogeneizadas fueron extraídos y homogeneizados con cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y luego filtrados.⁵⁷
- 2) El extracto crudo de lípidos así obtenido, se particionó con agua y la fase clorofórmica se evaporó bajo una atmósfera de nitrógeno. La metilación de los ésteres lipídicos se realizó con metóxido de sodio a temperatura ambiente. Los ésteres lipídicos se recuperaron en la fase hexano y se concentraron bajo flujo de nitrógeno.⁵⁸ La temperatura del horno del cromatógrafo de gas fue programada desde 180°C a 240°C (2°C/min.)
- 3) La identificación y cuantificación de los ácidos grasos de las dietas se llevó a cabo por cromatografía gaseosa (CG), utilizando un equipo CLAIRUS 500 de Perkin Elmer con detector de ionización de llama (detector FID).
- 4) La identificación de los ácidos grasos se realizó mediante el empleo de testigos comerciales (NU-Chek-PREP, INC. USA).
- 5) El contenido de ácidos grasos se expresó en porcentajes respecto al total detectados.

Parámetros Morfométricos

Para el análisis de los parámetros morfométricos se registraron los valores individuales de los ratones y las medias de cada grupo, de las siguientes variables: peso corporal, circunferencia de cintura y peso de tejido adiposo visceral. Para esto se procedió al adormecimiento de los animales

durante algunos segundos mediante el empleo de isoflurano como anestésico.

El peso corporal se obtuvo mediante el uso de una balanza analítica (Ohaus, Modelo CS200) en gramos (g)

La circunferencia de cintura se midió en la zona de mayor circunferencia de los animales. Se obtuvo con el uso de una cinta métrica en centímetros (cm).

Para estudiar el peso TAV se sacrificaron cuatro ratones de cada grupo a las 12 semanas y el resto de la muestra a las 24 semanas con el objetivo de extraer el TAV y registrar su peso. El sacrificio se hizo por medio de dislocación cervical luego del adormecimiento de los animales.

Histología Hepática y Cardíaca

Se estudió la histología hepática y cardíaca a las 12 y 24 semanas de estudio en aquellos animales sacrificados para la obtención del TAV. Para esto se extirparon dichos órganos y se recogieron en formaldehído al 10% en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 donde se mantuvieron entre 24 y 48 horas. Los órganos fueron enviados al laboratorio del INICSA-CONICET de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) para su procesamiento y coloración con hematoxilina-eosina (H-E) y se observaron en microscopio óptico. Los cortes histológicos fueron de secciones de 5 micras. Las imágenes histológicas se tomaron usando un microscopio Nikon Eclipse TE 2000U equipado con videocámara digital en el CIBICI- CONICET de la FCQ, UNC.

Parámetros Metabólicos

Para la obtención de muestras bioquímicas se realizó la extracción de sangre por punción cardíaca mediante la utilización de jeringas de tuberculina y agujas 25 G (Terumo), con el uso de heparina sódica (Abott 5000 U.I) como anticoagulante.

A continuación, se separó el plasma mediante centrifugación a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, utilizando ultra-centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D). Las muestras se conservaron en freezer a -80°C y se procesaron en el Laboratorio Central del Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina.

Determinación de enzimas hepáticas: la medición de la actividad de ALT y AST se realizó por el método enzimático-colorimétrico (kit de Roche) en un autoanalizador Hitachi modular P800.

Determinación de glucemia: la glucosa se cuantificó (mg/dL) por el método enzimático de la glucosa oxidasa y colorimetría según Trinder (Roche) utilizando el autoanalizador Hitachi modular P800.

Determinación de lípidos plasmáticos: se obtuvieron las concentraciones de triacilglicéridos (TG) y colesterol total (CT) plasmáticos mediante el uso de kits enzimáticos con colorimetría según Trinder (Roche), en un autoanalizador Hitachi modular P800. Las unidades empleadas fueron mg/dL.

Determinación de ApoB 100: La medición de la apoB100 se realizó en plasma a las 24 semanas de estudio (6MPT) por una técnica de inmunoturbidimetría, utilizando el aparato Hitachi Modular P800. Las unidades empleadas fueron mg/dL.

PLAN DE TRATAMIENTO DE LOS DATOS

En primer lugar se armó una planilla en Microsoft Excel, donde se cargaron los datos de los diferentes parámetros en estudio durante los 6 meses de intervención. Posteriormente se utilizó esta información para construir una base de datos.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se aplicaron procedimientos de estadística descriptiva (media y error estándar de la media) e inferencial, comparándose entre el grupo de ratones tratados con DC y aquellos alimentados con la DE. Se recurrió al programa GraphPad Prism 6 para realizar este análisis.

El análisis se realizó empleando el análisis de varianza de dos vías o factorial (ANOVA II) para evaluar los efectos del tratamiento (dietas), el tiempo de estudio y la interacción entre las variables. Se determinó la significancia de los factores y se realizaron luego pruebas paramétricas múltiples de test t de Student para el caso del efecto tratamiento para comparación entre dos medias. En aquellos casos, en los cuáles las varianzas fueron significativamente diferentes, se aplicó la corrección de Welch, que permite el cálculo de la p en esta situación (varianzas diferentes).

Para el análisis del factor tiempo, se empleó el ANOVA de una vía (ANOVA I) para establecer las diferencias de significación entre las medias y el post-test de Bonferroni y Tukey, cuando fue necesario.

Se tomó en cuenta un valor de $p < 0,5$ para considerar significancia estadística, con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

PERFIL LIPÍDICO DE LA DIETA

Con el fin de determinar el perfil de ácidos grasos constituyentes, se sometieron a análisis mediante cromatografía gaseosa (CG) ambas muestras de alimento. El contenido de ácidos grasos se expresó en porcentajes respecto al total.

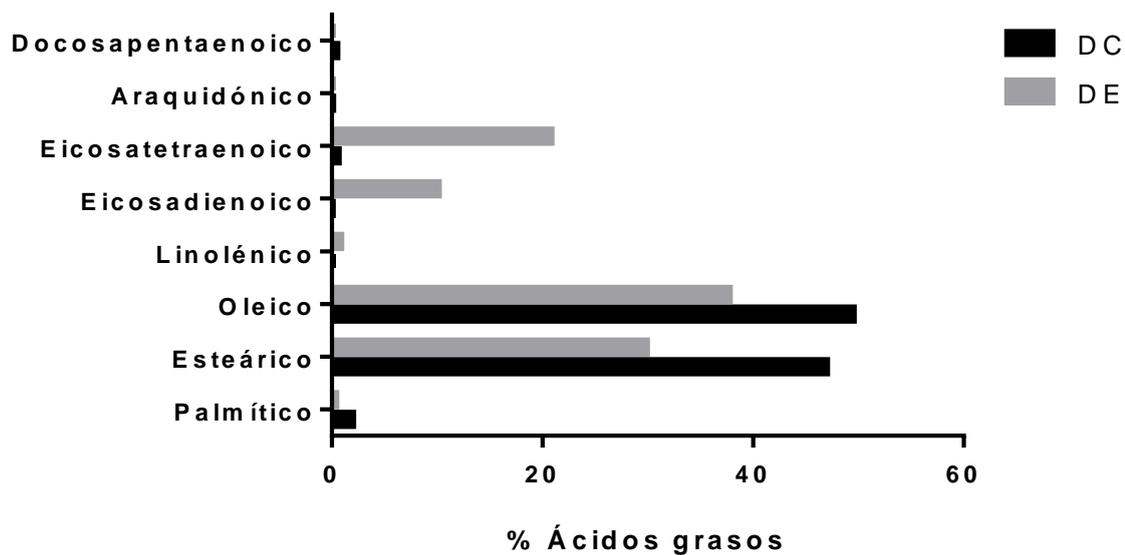
En relación a la dieta control (DC), se observó un claro predominio de AGMI y AGS. El ácido oleico (18:1 ω 9) resultó ser el más abundante con el 49,56%; del total de ácidos grasos detectados, en segundo lugar, se halló el ácido esteárico (18:0) con el 47% y en tercer lugar el ácido palmítico (16:00) con el 2,03%. De este modo sólo el 1,41% corresponde AGPI, manifestándose una relación ω 6: ω 3 de 1:5.

En cuanto a la dieta experimental (DE), la distribución cuantitativa de los diferentes tipos de ácidos grasos resultó más equitativa. Los AGS constituyeron el 30,32%, del total de ácidos grasos detectados, representados fundamentalmente por el ácido esteárico; los AGMI conformaron el 37,78% y los AGPI 31,9%. A diferencia de lo descrito en la DC, en este caso la relación ω 6: ω 3 fue de 1:2.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos en las dietas (% de ácidos grasos detectados)

ÁCIDOS GRASOS	DC	DE
Ácido Palmítico (16:0)	2,03	0,40
Ácido Esteárico (18:0)	47,0	29,92
Ácido Oleico (18:1 ω9)	49,56	37,78
Ácido Eicosadienoico (20:2 ω6)	0,09	10,14
Ácido Araquidónico (20:4 ω6)	0,13	
Ácido Linolénico (18:3 ω3)		0,90
Ácido Eicosatetraenoico (20:4 ω3)	0,66	20,86
Ácido Docosapentaenoico (22:5 ω3)	0,53	

Figura 1. Distribución porcentual de AG segun dieta



PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

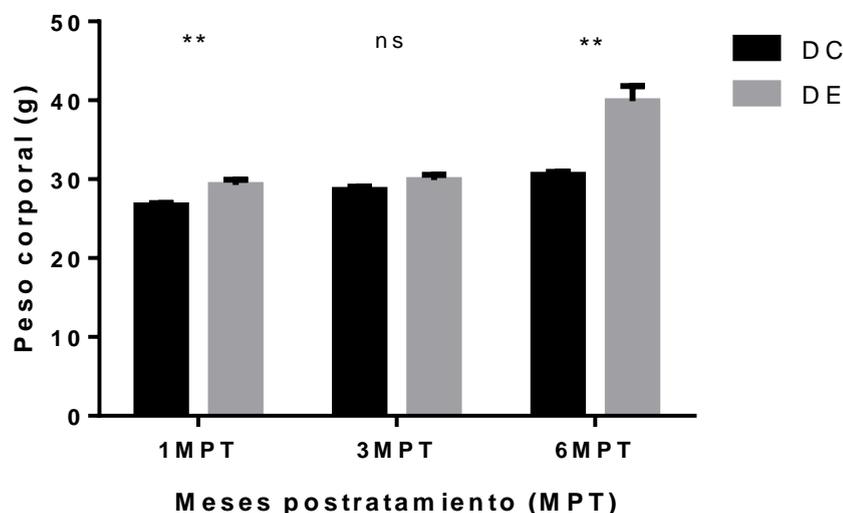
Peso Corporal (PC)

El registro del PC permitió demostrar diferencias estadísticamente significativas al primer y al sexto mes de estudio, siendo mayor la ganancia de peso de los animales del grupo sometido a la DE versus DC.

Los valores de las medias encontrados en el grupo alimentado con la DC fueron 26,6; 28,6 y 30,5 g al 1, 3 y 6 MPT respectivamente. En cuanto a los animales tratados con la DE, las medias fueron 29,2; 29 y 39,8 g a cada tiempo de estudio.

Además, mediante el análisis por ANOVA II se observó que la variable PC fue dependiente de los factores dieta, tiempo y de la interacción entre ambos ($p < 0,0001$).

Figura 2. Peso corporal de ratones TLR-2 KO



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n = 4-6$ animales por grupo. ns: no significativo $p > 0,05$; ** $p < 0,01$.

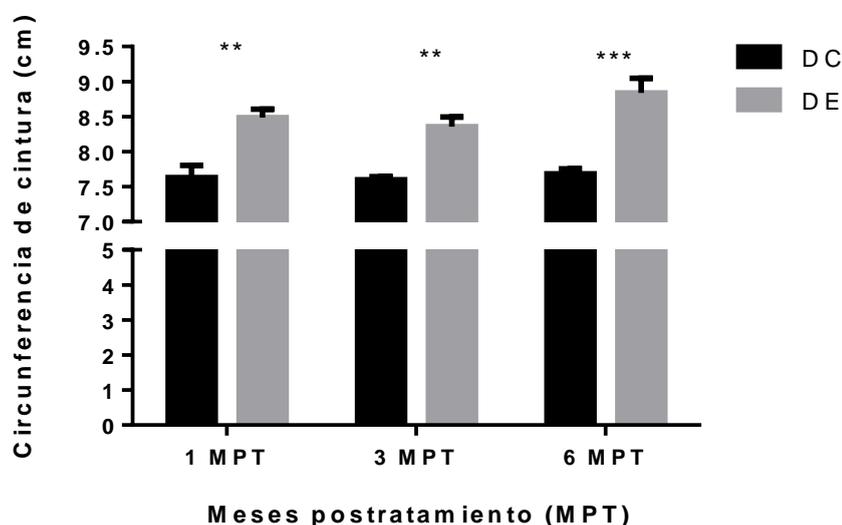
Circunferencia de Cintura (CC)

La CC se evaluó con la finalidad de determinar su asociación con el desarrollo de obesidad central. Se observaron diferencias significativas entre los grupos DC y DE en todos los tiempos, siendo mayores las medias correspondientes al grupo DE.

Los valores medios encontrados en los animales tratados con la DC fueron 7,6 cm en todos los tiempos de estudio mientras que en aquellos tratados con la DE las medias halladas fueron 8,4; 8,3 y 8,8 cm al 1, 3 y 6 MPT respectivamente.

Al aplicar el análisis de ANOVA II se observó que la variación de la CC dependió únicamente del factor dieta y no de la interacción entre ésta y el tiempo ($p < 0,0001$ y $p > 0,05$ respectivamente).

Figura 3. Circunferencia de cintura en ratones TLR-2 KO



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n = 4-6$ animales por grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

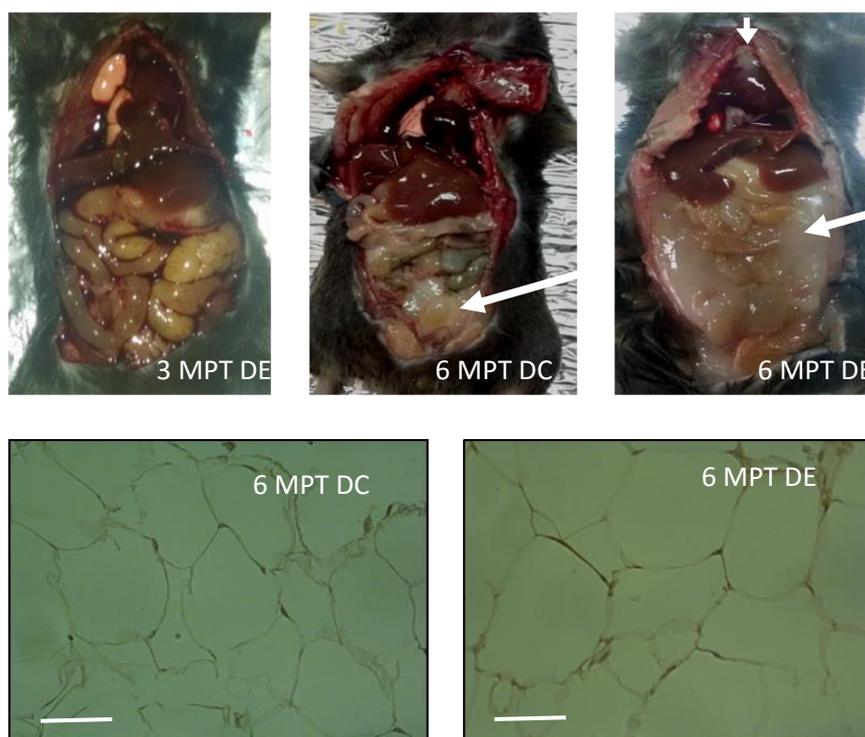
Tejido adiposo visceral (TAV)

A los 3 MPT no se observó acumulación de TAV en ninguno de los grupos de estudio. Esta situación se modificó a los 6 MPT donde se observó en todos los animales alimentados con DE una acumulación significativa de TAV, fenómeno que sólo se evidenció en dos de los animales alimentados con DC pero en escasa cantidad.

La cantidad promedio de TAV en los animales del grupo sometido a la DE fue del 4,3% respecto al peso corporal individual de los mismos.

Además de las diferencias cuantitativas mencionadas anteriormente, el estudio microscópico del TAV de ambos grupos reveló características morfológicas celulares distintas, los adipocitos pertenecientes a los animales tratados con DE mostraron una marcada hipertrofia celular. Sin embargo, es de destacar, que en ninguno de los casos se halló infiltración de células inmunes.

Figura 4. Macroscopía y microscopía de TAV



(A) Fotografía representativa de un ratón TLR 2 KO a los 3 MPT alimentado con DE. (B) Fotografías de animales a los 6 MPT con ambos tipos de dieta. Las flechas señalan el TAV y la cabeza de flecha la grasa ectópica a nivel pericárdico. (C) Microfotografías representativas del TAV extraído en ambos grupos. H-E. Magnificación 400x.

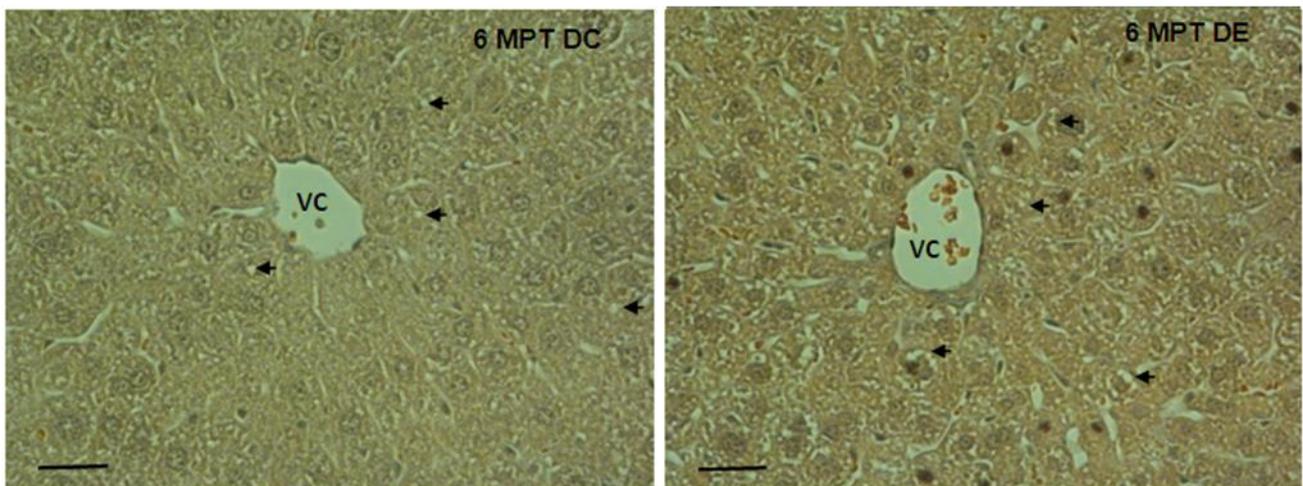
PARÁMETROS HISTOLÓGICOS

Se realizó el estudio y análisis de los cortes histológicos del hígado y el corazón a los 6 MPT en ambos grupos experimentales.

Estudios Histológicos del Hígado

En ambos grupos de estudio se observó presencia de lípidos ectópicos dispuestos en microvesículas, compatible con esteatosis simple leve, sin alteraciones en la estructura de los lobulillos, presencia de focos de infiltrado inflamatorio crónico, ni necrosis de las células hepáticas.

Figura 5. Histología del parénquima hepático de ratones TLR2-KO 6 MPT

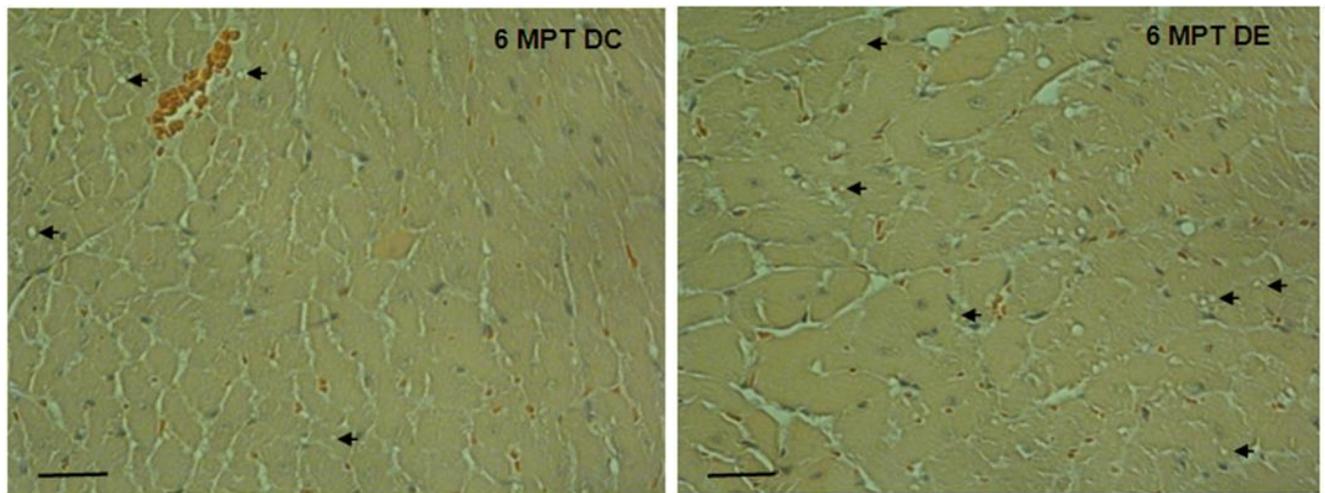


Microfotografías del parénquima hepático de animales alimentados con DC y DE, coloreadas con H-E y magnificación de 400X. Las cabezas de flecha señalan el acúmulo de lípidos ectópicos dispuestos en microvesículas. VC: Vena centrolobulillar.

Estudios Histológicos del corazón

En ambos grupos de estudio se observó depósitos de lípidos intramiocárdicos, dispuestos en microvesículas (en mayor cantidad en la DE), sin evidencia de daño estructural de los miocardiocitos y ausencia de infiltrado de células mononucleares inflamatorias.

Figura 6. Histología del tejido cardíaco de ratones TLR2-KO 6 MPT



Microfotografías del tejido cardíaco de animales tratados con DC y DE, coloreadas con H-E. Magnificación 400x. Las cabezas de flecha señalan el depósito de lípidos en forma de microvesículas.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Enzimáticos

Actividad de Transaminasas. Aspartato amino transferasa (AST) y Alanino amino transferasa (ALT)

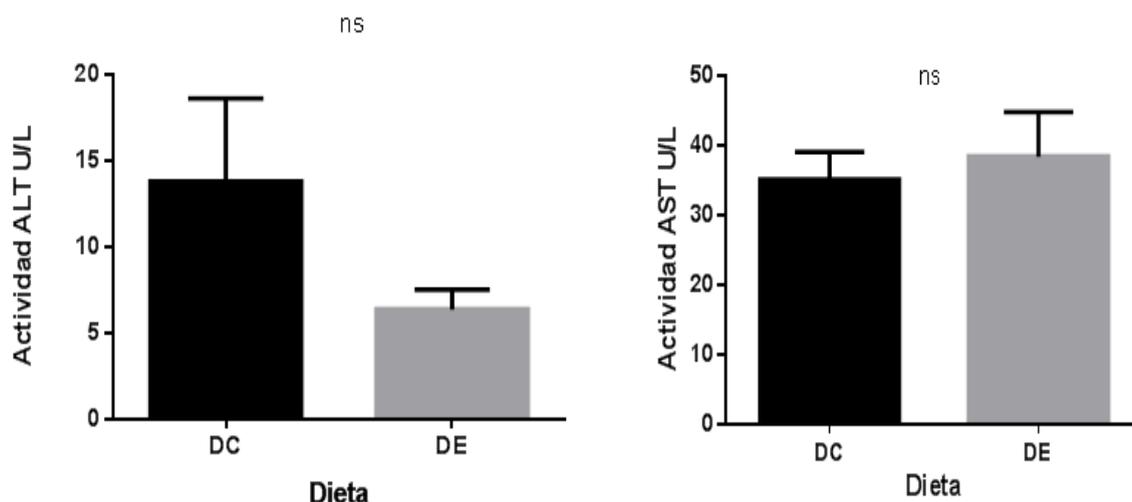
Estas enzimas se determinaron a los 6 MPT con el propósito de demostrar una posible alteración en su actividad que indicara la presencia de daño en hígado y/o corazón en los grupos bajo tratamiento dietario.

El análisis estadístico no permitió demostrar diferencias de significación entre los grupos DC y DE ($p > 0.05$) en ninguna de las enzimas.

La media y el EEM para los niveles de ALT fueron 13,8 y 4,8 U/L respectivamente para los animales alimentados con DC a diferencia del grupo DE donde, sorprendentemente, se observó una tendencia hacia niveles menores de actividad con media y EEM de 6,37 y 1,14 U/L.

En el caso de la AST, los valores para la media y el EEM fueron, respectivamente, 35,2 y 3,9, U/L en los animales alimentados con la DC y 38,4 y 6,4 U/L en aquellos tratados con la DE.

Figura 7. Actividad de Transaminasas en ratones TLR- 2 KO 6 MPT



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n=4-6$ animales por grupo. ns: no significativo ($p > 0,05$).

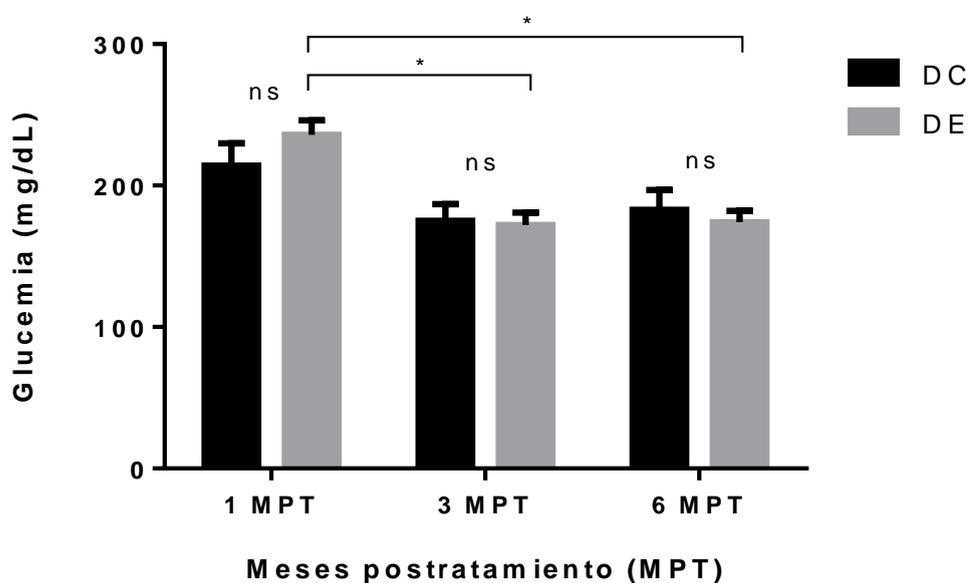
Metabólicos

Glucemia

El análisis estadístico de la glucemia entre los grupos no demostró diferencias significativas en ninguno de los tiempos de estudio. Las medias encontradas en los animales tratados con DC fueron 214; 175,2 y 182,8 mg/dL al 1, 3 y 6 MPT respectivamente. En el caso de los animales tratados con DE los valores medios fueron 235,8; 172 y 174 mg/dL a cada tiempo.

El análisis por ANOVA II permitió demostrar ausencia de interacción entre los factores dieta y tiempo ($p > 0,05$). El factor dieta no fue significativo ($p > 0,05$) pero si resultó significativa la variable tiempo de estudio ($p < 0,001$). Por este motivo se realizó en el grupo tratado con DE el análisis por ANOVA I para evaluar las diferencias entre los tiempos, éste mostró una disminución significativa a los 3 y 6 MPT vs 1MPT ($p < 0,05$).

Figura 8. Glucemia de ratones TLR-2 KO



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n = 4-6$ animales por grupo. * $p < 0,05$. ns: no significativo $p > 0,05$

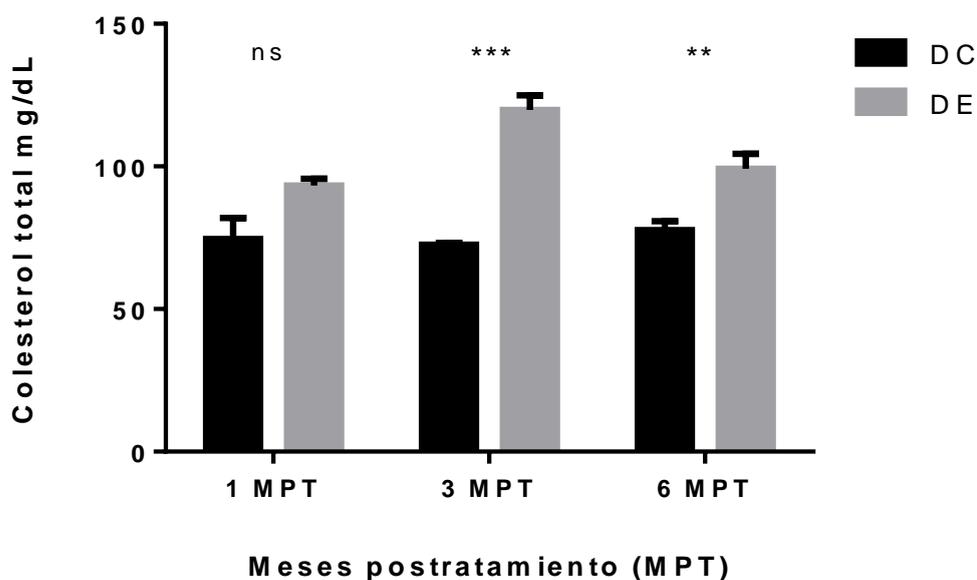
Colesterol Total (CT)

Los niveles de CT mostraron aumentos estadísticamente significativos en los animales sometidos a la DE comparado al grupo que recibió la DC en el tercer y sexto mes de estudio.

Las medias de los animales tratados con DC fueron 74,5; 72,5 y 77,6 mg/dL al 1, 3 y 6 MPT respectivamente. Los valores medios para los animales alimentados con la DE fueron 93,25; 119,8 y 99,13 mg/dL en cada tiempo de estudio.

Al aplicar el análisis por ANOVA II se observó una dependencia significativa del colesterol total con los factores dieta ($p < 0,0001$), tiempo y la interacción de ambos ($p < 0,05$ en estos últimos).

Figura 9. Colesterol de ratones TLR-2 KO



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n = 4-6$ animales por grupo. ns: no significativo $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Triacilglicéridos (TAG)

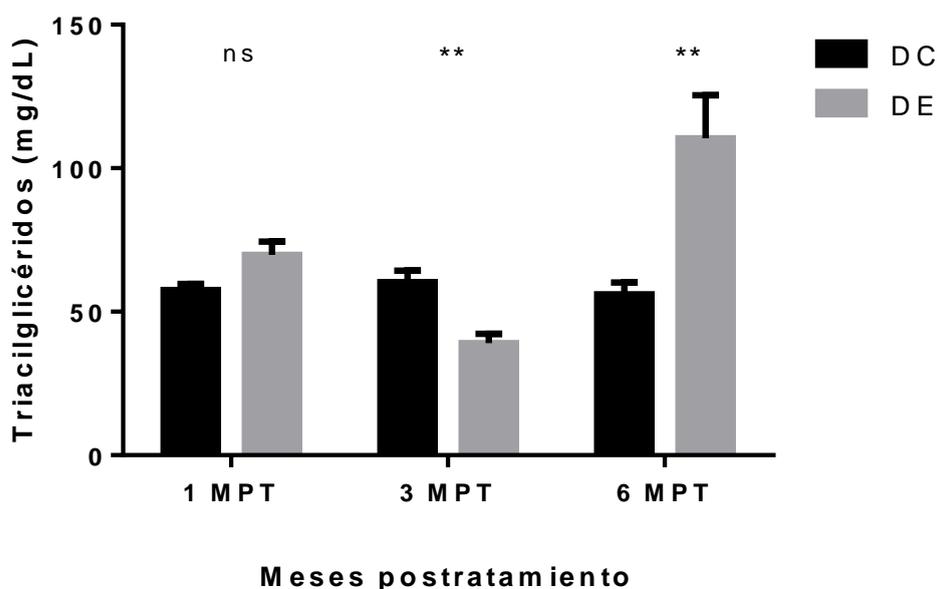
De manera similar al colesterol total, sólo se hallaron diferencias significativas al tercer y sexto mes de estudio.

Las medias para los animales alimentados con DC fueron 57,5; 60,3 y 56 mg/dL al 1, 3 y 6 MPT respectivamente. En lo que refiere a los animales tratados con DE los valores medios hallados fueron 69,7; 39 y 110; 4 mg/dL en cada tiempo.

Llamativamente, al 3 MPT la media del nivel de los TAG fue más elevada en el grupo de animales que recibieron la DC, mientras que, un efecto contrario pudo demostrarse en el 6 MPT, donde los animales sometidos a la DE mostraron niveles significativamente elevados respecto a los que recibieron la DC.

Por otro lado, a través del análisis ANOVA II se observó dependencia con el factor tiempo y la interacción entre los factores tiempo y dieta ($p < 0,01$ para ambos casos), contrariamente a lo que ocurre con el factor dieta ($p > 0,05$).

Figura 10. Triacilglicéridos de ratones TLR-2 KO



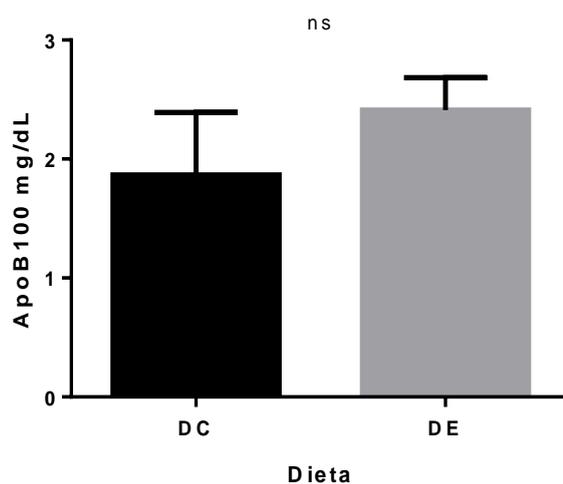
DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con $n = 4-6$ animales por grupo. ns: no significativo $p > 0,05$; ** $p < 0,01$

Apolipoproteína B 100 (Apo B100)

El análisis estadístico de los niveles de la ApoB100, principal componente proteico estructural de las lipoproteínas de muy baja y baja densidad (VLDL y LDL respectivamente) no permitió demostrar diferencias significativas a los 6 MPT entre los animales sometidos a la dieta DC y DE. Sin embargo, se pudo apreciar una tendencia hacia niveles mayores de la ApoB 100 en el grupo DE comparado al grupo DC.

Los valores de la media y el EEM para los animales tratados con DC fueron 1,86 y 0,52 mg/dL respectivamente. Respecto a los animales alimentados con la DE los valores observados fueron 2,41 y 0,27 mg/dL.

Figura 11. Apo B100 de ratones TLR-2 KO 6 MPT



DC vs DE. Los datos son expresados como la media \pm EEM de un experimento con n= 4-6 animales por grupo. ns: no significativo $p > 0,05$.

DISCUSIÓN

A partir de los análisis efectuados en este trabajo de investigación, nuestro modelo experimental fue eficaz en inducir una expansión del compartimento adiposo a nivel central en un modelo murino de ratones C57BL/6 TLR2-KO logrando reproducir ciertas alteraciones a nivel morfológico, metabólico e histológico análogas a las descritas en el síndrome metabólico. A continuación se discutirá acerca del rol que estaría cumpliendo la DE en comparación con la DC administradas en el desarrollo de las alteraciones observadas en estos animales del mismo *background* genético. Oportunamente, también se analizarán los hallazgos relacionados con la temática que han sido sugeridos por otros autores.

El análisis tanto de la DC como de la DE por cromatografía de gas nos permitió cuantificar el perfil de ácidos grasos presente en cada una de ellas. Es importante destacar que, sorprendentemente, la DC presentó casi el 50% de su perfil lipídico representado por AGS y menos de un 2% de AGPI a diferencia de la DE, donde se encontró aproximadamente un 30% tanto de AGS como de AGPI y la relación $\omega 6:\omega 3$ en ésta fue de 1:2, semejante a la propuesta recientemente por Simopoulos como factor protector de obesidad (1-2:1) a diferencia de lo que ocurre con la relación promedio del patrón alimentario occidental actual que oscila en 15-20:1, asociada a la ocurrencia de múltiples trastornos metabólicos e inflamatorios ²⁶En este sentido, la dieta occidental actual posee un exceso de ácidos grasos $\omega 6$ y un déficit de $\omega 3$ debido a una ingesta elevada de aceites, mayonesas y productos elaborados con aceites vegetales en su composición.⁵⁸

En cuanto a los parámetros morfométricos, el PC de los animales sometidos a la DE, como era de esperar, mostró un aumento significativo comparado con los que recibieron la DC. El incremento del PC sería atribuible al mayor aporte calórico de la DE, ya que como refirieron Cabalén y col en estudio semejante realizado previamente en nuestro laboratorio, no se observaron diferencias significativas entre las cantidades consumidas según el

tipo de dieta suministrada. Además, este estudio, realizado en ratones salvajes (*wild-type*) del mismo *background* genético, y deficientes en TLR 4, sometidos a similares condiciones nutricionales mostró que el PC fue mayor en todos los tiempos estudiados en los grupos alimentados con la dieta obesogénica.¹¹ Igualmente, Pinel y col utilizando ratones WT y ob/ob también encontraron que los animales sometidos a dietas ricas en grasas (suplementadas o no con AGPI) tuvieron mayor ganancia de peso en comparación con la DC.⁵⁹ Estos resultados llevan a concluir que independientemente de la base genética del animal y de la composición de AGs de la dieta, el PC aumenta por la administración de dietas hipercalóricas.

En función de la importancia que actualmente se le adjudica al patrón de distribución del componente graso, resulta importante destacar que el aumento del PC fue acompañado por un incremento significativo de la CC en el grupo DE en todos los tiempos evaluados.

El aumento de ambos parámetros es compatible con la denominada “obesidad central” desarrollada en humanos, donde la CC constituye uno de los indicadores subrogados más utilizados en la práctica clínica. Valores de CC por encima de los puntos de corte establecidos para humanos (específicos para distintas etnias) se relacionan con una mayor probabilidad de desarrollar consecuencias metabólicas adversas⁶⁰

En concordancia con estos descubrimientos se evidenció un aumento en la cantidad de TAV a los 6 MPT en los animales alimentados con la DE. El aumento de tamaño de la célula adiposa, es considerado responsable de inducir eventos tales como estrés oxidativo (aumento de especies reactivas del oxígeno, ROS), estrés del retículo endoplásmico, hipoxia tisular y disfunción endotelial.^{25,61} Un hallazgo distintivo del análisis histológico en TAV fue que, a pesar de existir una hipertrofia notoria de los adipocitos, no se evidenció infiltrado de células inflamatorias, ni estructuras tipo corona siendo éstas lesiones típicas del proceso inflamatorio local en el TAV disfuncional (Fig.3C). Llamativamente, lo antes mencionado, podría estar señalando la presencia de un tejido adiposo no disfuncional y/o con disfunción mínima en el grupo sometido a la DE. Por tal motivo, se puede sospechar que el TA de estos

animales presenta en sus adipocitos un perfil secretor favorable, sintetizando y secretando adipocinas del perfil anti-inflamatorio (IL-4, IL-10, adiponectina, entre otras) y/o sugiriendo un balance entre el perfil pro (TNF-alfa, IL-1, IL-6, leptina) y anti-inflamatorio.

Estas características se asemejan a las encontradas en los pacientes denominados “obesos metabólicamente sanos”, los cuales se caracterizan, según la literatura existente, por presentar un bajo grado de inflamación tanto a nivel local (tejido adiposo) como sistémico; niveles de adiponectina similares a pacientes sin sobrepeso/obesidad; así como una menor prevalencia de NAFLD, entre otros.⁶²

Este resultado, no esperado y muy interesante podría ser explicado o ser consecuencia al menos en parte, de la composición cualitativa de la dieta en el contenido de AGPI, principalmente ω 3, que le conferiría al TAV características protectoras frente al riesgo de las co-morbilidades asociadas a la obesidad. Al respecto, hay un creciente cuerpo de evidencia que afirma que los AGPI ω 3 pueden atenuar la inflamación del tejido adiposo en roedores y humanos a partir de la disminución de las citocinas pro-inflamatorias y aumento de las antiinflamatorias, menor infiltración de macrófagos, disminución de eicosanoides pro-inflamatorios y formación de pro-resolvinas.^{10, 51, 63}

En consonancia con estas observaciones, Kim y col en su investigación con ratones transgénicos que sobreexpresaban adiponectina, mostraron que no sólo la cantidad de tejido adiposo, sino la calidad de los adipocitos que lo constituyen pueden tener un impacto significativo sobre la función metabólica sistémica.⁶⁶ Además, un estudio recientemente publicado por *Journal of Lipid Research* demostró que el EPA fue capaz de mejorar el balance adiponectina/leptina, lo cual podría contribuir al efecto protector de este en ratones sometidos a una dieta occidental⁵⁹ Consideramos que hubiese sido de gran valor para nuestro trabajo, realizar la determinación de dicha relación.

Por otra parte, el estudio histológico a nivel del tejido cardíaco y parénquima hepático mostró a los 6 MPT esteatosis simple leve a nivel intracelular, sin presencia de daño estructural o focos inflamatorios en ambos

grupos de estudio. Concordantemente, Kucera y col en el año 2011 hallaron semejantes resultados en hígado al estudiar el efecto de la composición de la dieta en el desarrollo de NAFLD.⁶⁵

Una serie de estudios previos han demostrado que dietas enriquecidas con AGS y azúcares simples, especialmente fructosa, conducen a un mayor riesgo de esteatosis hepática, en parte, a través del aumento de la lipogénesis *de novo*.⁴⁴ Por este motivo, se esperaba que los animales alimentados con la DE tuvieran un mayor grado de daño a nivel hepático en comparación con el grupo tratado con DC. Sin embargo, sorprendentemente, las características histológicas resultaron similares en ambos grupos. Por tal motivo, se presume que la DE posee algún efecto protector asociado al aporte de AGPI ω 3. Respaldo esta hipótesis, numerosas investigaciones han encontrado que la suplementación de ω 3 en ratas y ratones alimentados con dietas ricas en grasas así como en pacientes obesos tiene la capacidad de atenuar la esteatosis hepática a través de efectos antiinflamatorios y antioxidantes, disminución del contenido de lípidos hepáticos y marcadores inflamatorios, mejorando así la sensibilidad a la insulina, todos ellos, eventos primordiales en la prevención del desarrollo de NAFLD.^{51,66, 67}

En relación a los parámetros bioquímicos, de manera coincidente con los hallazgos histológicos, los niveles de actividad de ALT y AST en plasma a los 6 MPT no mostraron diferencias significativas entre los grupos, encontrándose dentro de los rangos de normalidad; resultados similares fueron reportados en el estudio de Kucera y col en el año 2011.⁶⁵ Sin embargo, llamativamente, se observó una tendencia hacia niveles menores de actividad de ALT de los animales alimentados con la DE, hallazgo que concuerda con las revisiones de Jin-Sik Bae y col y Del Ben Maria y col, en los años 2013 y 2015 respectivamente, donde los autores han reportado una reducción de la actividad de ALT en dietas suplementadas con AGPI ω 3.^{66, 67}

En lo que respecta a las demás cuantificaciones bioquímicas analizadas, se encontraron cambios significativos en los niveles de colesterol total y triacilglicéridos en el grupo de ratones sometidos a la DE, sin observarse

modificaciones en los niveles de glucemia. Los resultados son compatibles con la existencia de un fenotipo de dislipemia mixta sin progresión a DM2.

A pesar que la glucemia no experimentó diferencias significativas a ninguno de los tiempos, entre los grupos DC y DE; se demostró una disminución significativa a los 3 y 6 MPT comparado a 1MPT en los animales sometidos a la DE. Este fenómeno podría ser consecuencia de un hiperinsulinismo compensatorio, que sería suficiente a estos tiempos para regular la homeostasis de la glucosa, aún dentro de un contexto de insulino-resistencia hepática. No obstante, para corroborar esta hipótesis sería necesario determinar los niveles de la insulina y la glucemia en ayunas, para calcular el índice HOMA-IR (*Homeostatic model assessment*), parámetro que nos habría permitido objetivar la existencia de un estado de resistencia hepática a la insulina.

Es probable que el aporte graso de la dieta y la fructosa en el agua de bebida de la DE contribuyan al desarrollo de la IR. Diversos estudios experimentales en modelos murinos de ratón y rata, sometidos a distintas dietas, entre ellos, Kucera y col y Cabalén y col (2016) apoyan nuestros resultados.^{11, 65}

En línea con lo expresado anteriormente, se podría atribuir la disminución encontrada en los triacilgliceroles a los 3MPT en el grupo DE, a dos mecanismos mediados por el hiperinsulinismo. El primero de ellos, y con el que más acordamos, es el mayor catabolismo de las VLDL por la activación de la enzima lipoproteín lipasa endotelial (LPL), regulada por insulina, enzima responsable de la degradación partículas VLDL en el lecho vascular. El segundo mecanismo que podría estar implicado sería una disminución en la síntesis de VLDL, producida por el hiperinsulinismo compensatorio, que contribuiría a una reducción de la síntesis de la ApoB-100 y/o inhibición de la proteína transferidora de lípidos (MPT) hepática. Este mecanismo fue demostrado por Cummings y col (1995) en cultivo de células hepáticas *in vitro*.⁶⁸

Kucera y col, mencionados anteriormente, en su modelo experimental empleando ratas Wistar y Sprague-Dawley frente a distintas dietas grasas observaron una disminución similar a la observada en los TAG a un tiempo de estudio semejante.⁶⁵ Este hallazgo, permite avalar nuestro resultado que podría significar una manifestación bioquímica previa al establecimiento de un Síndrome Metabólico. Esta hipótesis se refuerza aún más teniendo en cuenta que los niveles de TAG a los 6MPT se encuentran significativamente aumentados en los animales alimentados con la DE.

Por otro lado, en relación al colesterol, si bien se encuentra aumentado de manera significativa a los 3 y 6 MPT en el grupo tratado con DE, este hallazgo amerita ser analizado en el contexto de qué lipoproteína lo está transportando principalmente. Esto se debe a que mediante las técnicas analíticas disponibles en los laboratorios de química clínica, no es posible separar las diferentes fracciones lipoproteicas en los roedores para luego cuantificar su contenido de colesterol. Esta limitación metodológica en nuestra investigación resulta particularmente importante para el colesterol-HDL. Más aún, considerando que numerosos estudios han demostrado que la suplementación con ω 3 sería capaz de incrementar los niveles plasmáticos de esta lipoproteína,^{10,51} por lo tanto se podría atribuir el aumento del colesterol total observado al aporte de esta fracción. Para confirmar esta presunción sería necesario realizar un perfil de lipoproteínas por electroforesis.

En conclusión, si bien el aumento de PC, CC y TAV generado por un excesivo aporte calórico, especialmente proveniente del aporte de lípidos puede implicar aumento del riesgo cardio-metabólico, el tipo de ácidos grasos constituyentes de la dieta puede condicionar una calidad diferente de los adipocitos, atenuando o retrasando la aparición de los disturbios metabólicos crónicos asociados a la obesidad.

Por último, teniendo en cuenta que la población con la que se trabajó en este modelo experimental fue carente para el receptor TLR2, creemos necesario confrontar nuestros hallazgos con estudios realizados en animales WT con el objetivo de identificar las posibles implicancias de la ausencia de este receptor. Para ello, nos apoyamos en los resultados presentados por una

investigación realizada previamente en nuestro laboratorio, donde si bien las características del tratamiento no son exactamente las mismas, consideramos pueden ser útiles en la comparación.¹¹

Una de las diferencias más destacables a partir de la confrontación de los resultados corresponde al acúmulo de TAV, donde los animales WT alimentados con dieta obesogénica (DO) mostraron desde los 3 MPT un depósito significativo de tejido adiposo acompañado a los 6 MPT por la presencia de estructuras tipo corona, mientras que los TLR 2 KO tratados con una dieta similar solo exhibieron TAV a los 6MPT y en menor cantidad. De manera similar, en lo que respecta a las características histológicas cardíacas y hepáticas, los animales WT sometidos a DO mostraron acumulación ectópica de lípidos en corazón y esteatosis hepática mixta a los 3 MPT, mientras que los animales TLR2 KO alimentados de manera similar solo presentaron esteatosis simple de grado leve en ambos órganos a los 6 MPT.

Por lo tanto, a partir de los hallazgos mencionados se podría especular que la carencia de TLR 2 en estos animales estaría contribuyendo a la protección de la acumulación de lípidos en el TAV así como a nivel hepático y cardíaco hasta los 6 meses de tratamiento. Esto concuerda con diversos estudios que proponen el efecto protector de la ausencia del TLR2 en la inflamación asociada a la obesidad.^{2, 9} Sin embargo, es importante ser cautelosos en la interpretación de estos resultados, ya que la mayoría de los estudios no se extienden más allá de las 12 semanas de investigación (3MPT). Además, la ausencia del TLR2 a tiempos prolongados, podría aumentar la activación del TLR4, mediante la acumulación de ligandos endógenos estériles generados durante los procesos metabólicos (DAMPs) como un efecto compensatorio.⁶⁹ Es decir, aún no existe un consenso sobre el rol del TLR2 en la inflamación crónica de bajo grado.

Asimismo, en relación al papel de los ω 3 también existen controversias en el rol de éstos en algunas características del síndrome metabólico relacionadas con la obesidad,^{10, 63} especialmente en aquellos estudios que conciernen a la clínica humana²⁶. Sin embargo, las investigaciones existentes coinciden en sus propiedades antiinflamatorias dadas por la inhibición en la

secreción de mediadores pro-inflamatorios, aumento en la formación de los anti-inflamatorios y reducción de la migración de macrófagos al TA, los cuales contribuirían en la prevención y/o disminución la inflamación crónica de bajo grado.⁵¹

Por este motivo y teniendo en cuenta que los ratones TLR2 KO tratados con la DE tuvieron ω 3 como parte de su dieta (nutriente no declarado en la dieta de los animales WT) y que los TLRs cumplen un rol primordial en la respuesta inmune innata, nosotros consideramos que el consumo de ω 3 no solo fue el factor más influyente en la protección de la inflamación sino que también sería una herramienta más factible de implementar que el bloqueo de estos receptores como un potencial complemento para el tratamiento de la obesidad.

En relación a la edad de los animales intervenidos, resulta necesaria una consideración final. Teniendo en cuenta que según las experiencias previas de nuestro laboratorio la expectativa de vida media de los ratones C57BL/6 es de dos años, seis meses de tratamiento representan un 25% de su vida y considerando el tiempo de vida al comienzo (12,5%), estos animales han sido evaluados aproximadamente durante el 40% de su vida, por lo tanto, este es un factor que realza el valor de los resultados obtenidos en esta investigación.

CONCLUSIONES

El seguimiento de un modelo murino intervenido con diferentes tratamientos dietarios por un período de 24 semanas nos permitió confirmar parcialmente la hipótesis planteada mediante el cumplimiento de los objetivos propuestos.

Elaborar el presente trabajo nos permitió profundizar nuestros conocimientos acerca de los mecanismos fisiopatológicos que gobiernan la respuesta inflamatoria crónica de bajo grado asociada a la obesidad, como también mecanismos de resolución de dicha respuesta vinculada especialmente con ciertos nutrientes y su acción anti-inflamatoria.

En este sentido, nos apropiamos de conceptos tan complejos como útiles que podremos aplicar a futuro tanto en el ámbito educativo como asistencial. Asimismo, vivenciamos una íntima aproximación al área de investigación, que corresponde posiblemente a una de las funciones menos desarrolladas del perfil profesional de Licenciado en Nutrición y que simultáneamente representa un insumo básico para el avance y perfeccionamiento de cualquier disciplina. Si bien la ciencia básica no tiene fines prácticos inmediatos, posee el potencial de profundizar y/o generar un cúmulo de conocimientos en torno a un área temática en particular, que a futuro puedan tener aplicabilidad y someterse a comprobación en la investigación clínica pudiendo redundar en algún beneficio en la intervención con pacientes.

Nuestro trabajo, en consonancia con muchos otros, remarca que la obesidad como enfermedad compleja y multi-determinada no puede reducirse a un estado de balance energético positivo y un consecuente incremento cuantitativo de los depósitos lipídicos, si no que cobra especial relevancia la características cualitativas del tejido adiposo y su comportamiento desde el punto de vista inmunitario, endócrino e inflamatorio ya que esto, condiciona la aparición y evolución de co-morbilidades que incrementan el riesgo relativo de los individuos obesos. En este contexto, cambios el estilo de vida y dentro de ellos, las modificaciones dietéticas que permitan modular favorablemente el proceso descrito resultan del mayor interés considerando las altas

prevalencias de sobrepeso y obesidad presentes en la sociedad actual tanto a nivel local como global.

Por tanto, consideramos que se deberían dirigir los esfuerzos a un abordaje dietoterapéutico, en el marco de un tratamiento integral, que contemple no solamente una restricción calórica sino que además tenga en cuenta la calidad de la alimentación, haciendo particular énfasis en el consumo adecuado de ácidos grasos $\omega 3$ y una consecuente relación $\omega 6:\omega 3$ óptima, como una estrategia fundamental para favorecer la resolución de la inflamación crónica de bajo grado que junto a la insulino-resistencia constituyen nexos fisiopatológicos claves en el desarrollo de las co-morbilidades asociadas a la obesidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para enfermedades no transmisibles. Presentación de principales resultados.[Internet].2014.[citado sept/2014]. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/prensa/index.php?option=com_content&view=article&id=2232:encuesta-nacional-de-factores-de-riesgo-marca-reduccion-en-el-consumo-de-sal-y-en-exposicion-al-humo-de-tabaco-ajeno&catid=6:destacados-slide2232
2. Fortis A, García-Macedo R, Maldonado-Bernal C, Alarcón-Aguilar F, Cruz M. El papel de la inmunidad innata en la obesidad. *Salud Pública Mex.* 2012; 54:171-177.
3. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and Regulation of the Pattern Recognition Receptors in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *Nutrients.* 2013; 5:3757-3778.
4. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Nature* 2006; 13:816–825.
5. Kawasaki T, Kawai T. Toll- like receptor signaling pathways. *Front immunol.* 2014; 5:461.
6. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L et al. Saturated Fatty Acid Activates but Polyunsaturated Fatty Acid Inhibits Toll-like Receptor 2 Dimerized with Toll-like Receptor 6 or 1. *J Biol Chem.* 2004; 279:16971–16979.
7. Schwartz EA, Zhang WY, Karnik SK, Borwege S, Anand VR, Laine PS, et al. Nutrient Modification of the Innate Immune Response A Novel Mechanism by Which Saturated Fatty Acids Greatly Amplify Monocyte Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:802-808.
8. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology.* 2008; 126:233–245.
9. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome- mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through

TLR2 activation; Modulation by dietary fatty acids. *J Immunol.* 2013; 191:4337-4347.

10. Lorente-Cebrián SL, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martínez JA, Moreno-Aliaga M. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem.* 2013; 69:633–651.

11. Tesis Doctoral. Cabalén ME. Impacto de la infección con *Trypanosoma cruzi* y la nutrición sobre la expresión de receptores innatos y parámetros inmuno- metabólicos en un modelo de obesidad. Córdoba: Universidad Católica de Córdoba; 2015. Copia en la Biblioteca Jean-Sonnet.

12. Betanzos-Cabrera G, Estrada-Luna D, Belefant-Miller H, Cancino-Díaz JC. Mice fed with a high fat diet show a decrease in the expression of “toll like receptor (TLR)2 and TLR6 mRNAs in adipose and hepatic tissues. *Nutr Hosp.* 2012; 27:1196-1203.

13. Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science.* 2013; 339:172–177.

14. Farreras Valentí P. *Medicina Interna.* Vol 1. 17ª ed. Rozman C, editor. España: Elsevier; 2012.

15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* 7ª ed. España: Elsevier; 2012.

16. Marcos A. *Inmunonutricion en la salud y la enfermedad.* España: Editorial Médica Panamericana, SA; 2011.

17. Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll:entre el reconocimiento de lo propio no infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología.* 2006;25:115-130.

18. Martínez Moreno JA, Hernández López JC, Urcuqui- Inchima S. La estimulación de TLR, receptores tipo NOD y dectina-1 en neutrófilos humanos induce la producción de citocinas pro-inflamatorias. *Iatreia.* 2014; 27:135-146.

19. Kuo LH, Tsai PJ, Jiang MJ, Chuang YL, Yu L, Lai KTA et al. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia.* 2011; 54:168–179.

20. Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Med Microbiol Immunol*. 2012; 201: 145-155.
21. Blanco A, Blanco G. *Bioquímica Biológica: Renovada y actualizada*. 9° ed. Buenos Aires. Cap. 5. Editorial El Ateneo. 2010. p. 96-113.
22. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91:502–9
23. Connaughton RM, McMorrow AM, McGillicuddy FC, Lithander FE, Roche HM. Impact of anti-inflammatory nutrients on obesity-associated metabolic-inflammation from childhood through to adulthood. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2016; 75: 115–124
24. Mozaffarian D. Nutrition and Cardiovascular and Metabolic Diseases. En: Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P, editores. *Braunwald's Heart Disease a Textbook of Cardiovascular Medicine*. 10ª ed. China: Elsevier; 2015. p. 1001-12
25. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr Hosp*. 2015; 31:2352-2358.
26. Marventano S, Kolacz P, Castellano S, Galvano F, Buscemi S, Mistretta A y col. A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter?. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. [Internet]. 2015. [Consultado el 20 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2015.1077790>
27. Rodríguez-Cruz M, Trovar AR, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poli-insaturados y sus beneficios en la salud. *Rev. Invest. Clín*. 2005; 57: 457-472
28. Soto CV, Vergara WE, Neciosup PE. Prevalencia y factores de riesgo de síndrome metabólico en población adulta del departamento de Lambayeque, Perú - 2004. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. 2005; 22: 254-261
29. Simopoulos A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*. 2016; 8: 128.

30. White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008; 88,1716S–1721S
31. Kolderup A, Svihus B. Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity. *Journal of Nutrition and Metabolism*. [Internet].2015 [Consultado el 21 Agosto 2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/823081>.
32. Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *Journal of the American Dietetic Association*.2010; 110:1307–1321.
33. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, y col. Streptozotocin- Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. *BioMed Research International*. [Internet] 2014. [Consultado el 20 Octubre 2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/819065>.
34. Jinzi W, Liang-Jun Y. Streptozotocin- induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanism of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*.2015; 8: 181-188.
35. Lenzen S. The mechanism of alloxan- and streptozotocin- induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51: 216-226.
36. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong JM, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *National Institutes of Health*. 2011;3:131-140.
37. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep*. 1963;29:91–98
38. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000, 49:1390–1394.
39. Mansor LS, González ER, Cole MA, Tyler DJ, Besson JH, Clarke K. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology*. 2013; 12:136.

40. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
41. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic síndrome a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366(9491):1059-62.
42. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, y col. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120(16):1640-5.
43. Castro L, Silva G. Hígado graso no alcohólico. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2015; 26 (5):600-612.
44. Jinshen Y, Sharon M, Junbo H, Wenke F, Chaodong W. The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterology Research and Practice*. [Internet]. 2016. [Consultado el 15 de Junio de 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2862173>
45. Ministerio de Salud de la Nación. Guía de Practica Clínica Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento de la Obesidad en adultos, Buenos Aires 2014.
46. Acosta-García E. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (2): 183-94.
47. Pérez Miguelsanz MJ, Cabrera Parra W, Varela Moreiras G , Garaulet M. Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr Hosp*. 2010; 25:207-223
48. León-Pedroza JI, González-Tapia LA, del Olmo-Gil E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G, González-Chávez A. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y cirujanos*. [Internet].2015. [Consultado el 30 Agosto 2015]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>.

49. Guzman-Flores JM, Lopez-Briones S. Celulas de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. *Gaceta medica de Mexico*. 2012;148:381-9.
50. Poulain-Godefroy O, Le Bacquer O, Plancq P, Lecoœur C, Pattou F, Fruhbeck G y col. Inflammatory Role of Toll-Like Receptors in Human and Murine Adipose Tissue. *Mediators of Inflammation*. [Internet].2010 [Consultado el 14 Septiembre2015] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/823486>.
51. Martínez-Fernández L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Mediators Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic síndrome. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2015; 121: 24–41.
52. Lorente-Cebrián SL, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Laiglesia LM, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. An update on the role of ω -3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. *J Physiol Biochem*. 2015; 71(2):341-9.
53. *Diccionario de Nutrición y Dietoterapia*. 5ta ed. Mexico. Mc Graw Hill; 2007.
54. García Martín M, Zurita Molina A. Transaminasas: Valoración y significación clínica *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP*. 2010. Cap 12.
55. *Diccionario Mosby de Medicina, Enfermería, y Ciencias de la Salud*. 6ta ed. Elsevier; 2003.
56. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J BiolChem* 1957; 226:497-509.
57. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964; 5:600-608.
58. Gil Hernández A. *Tratado de Nutrición*. Tomo II. 2º ed. Madrid, España. Editorial Panamericana. 2010.

59. Pinel A, Pitois E, Rigaudiere JP, Jouve C, De Saint-Vincent S, Laillet B y col. EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a Western diet. *Journal of lipid Research*. [Internet]. 2016. [Consultado el 10 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://www.jlr.org/content/57/8/1382.long>
60. Bays H. Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014; 21: 345-351.
61. Klöting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. [Internet]. 2014. [Consultado el 20 de Julio de 2016].
62. Muñoz-Garach A, Cornejo-Pareja I, Tinahones FJ. Does Metabolically Healthy Obesity Exist? . *Nutrients*. 2016; 8: 320.
63. Wang Y, Huang F. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation in Obesity: Local Effect and Systemic Benefit. *BioMed Research International* [Internet]. 2015. [Consultado el 1 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/581469>.
64. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM y col. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007; 117(9):2621-37.
65. Kučera O, garnol T, lotková H, staňková P, mazurová Y, Hroch M y col. The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiol. Res*. 2011; 60: 317-328.
66. Jin-Sik Bae, Ah-Reum Oh, Ji-Young Cha. Regulation of Cholesterol Metabolism in Liver: Link to NAFLD and Impact of n-3 PUFAs. *Journal of Lifestyle Medicine*. 2013; 3, (1):19-25.
67. Del Ben M, Polimeni L, Baratta f, Pastori D, Angelico F. The role of nutraceuticas for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*. [Internet]. 2016. [Consultado el 1 de Julio de 2016].
68. Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM, Hennessy TR, Kelly JM, Jackson NC, y col. Acute hyperinsulinemia decreases the hepatic secretion of

very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetes* .1995; 44: 1059-1065.

69. Rivera CA, Gaskin LT, Allman M, Pang J, Brady K, Adegboyega P y col. Toll-like receptor-2 deficiency enhances non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterology*. 2010; 10:52.

ANEXOS

Figura 1. Estructura y localización de TLRs. Tomado de Abbas AK y col. "Inmunología celular y molecular", 2012.

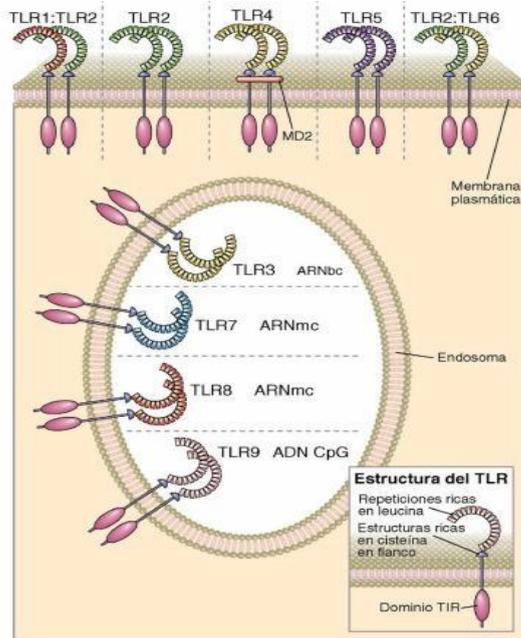


Figura 2. TLRs, ligandos y proteínas adaptadoras. Tomado de Akira S y col. "TLR signaling", 2006.

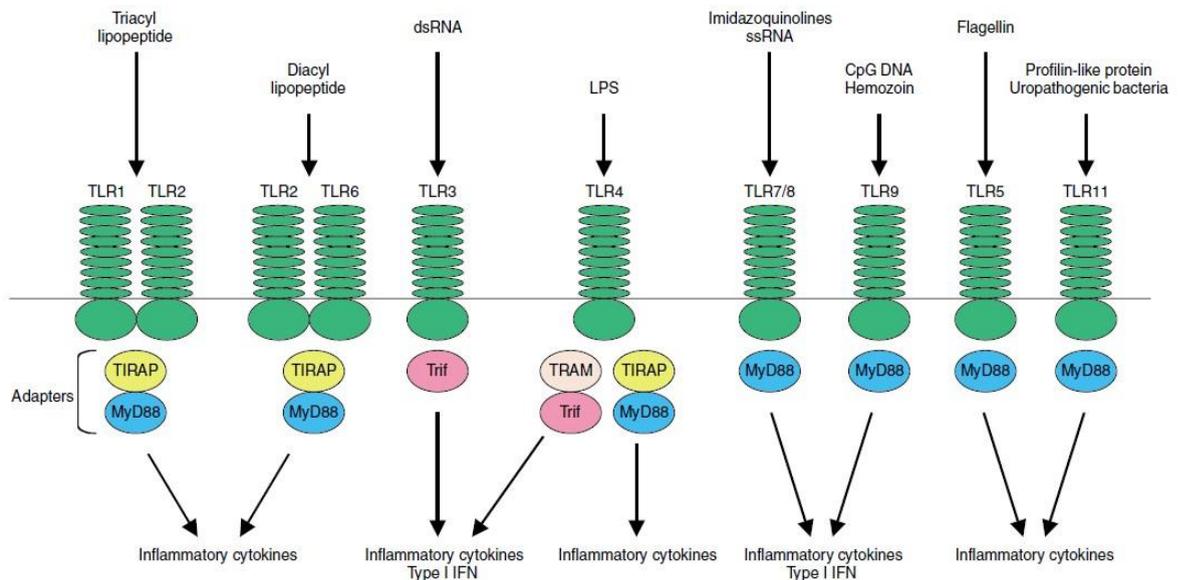


Figura 3. Estructura química de la estreptozotocina. Tomado de Jinzi W y col. "Streptozotocin- induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanism of diabetic β cell glucotoxicity", 2015.

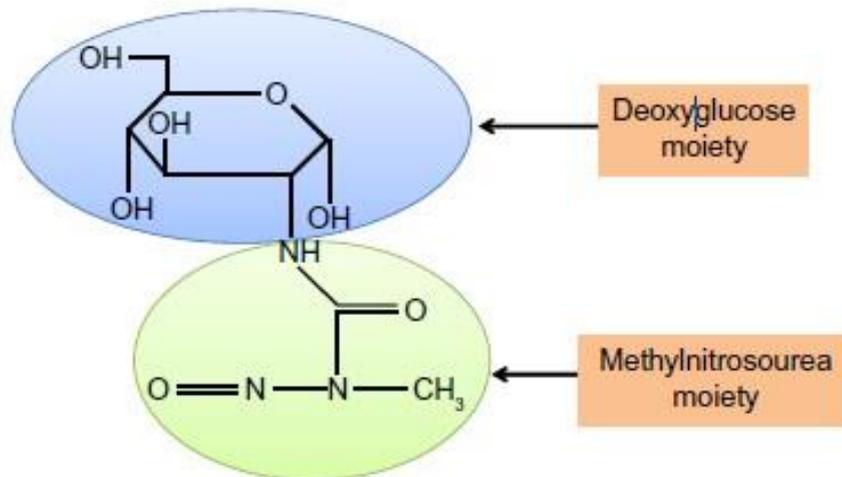


Figura 4. Efecto de la STZ en las células β pancreáticas tomado de Jinzi W y col. "Streptozotocin- induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanism of diabetic β cell glucotoxicity", 2015.

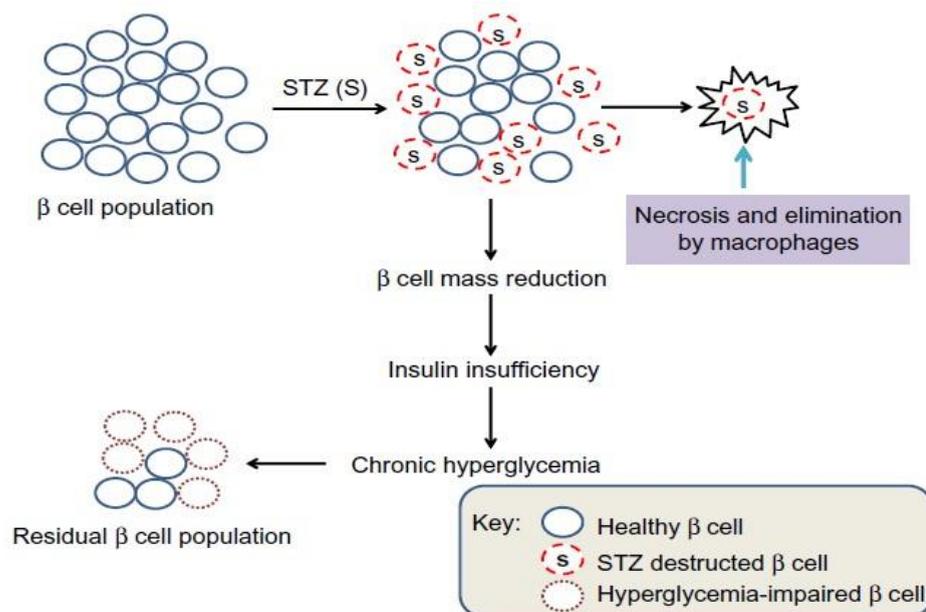


Figura 5. Inflamación y cambios en tejido adiposo visceral.
 Tomado de Watanabe Y. y col "Activation and Regulation of the
 Pattern Recognition Receptors in Obesity- Induced Adipose
 Tissue Inflammation and Insulin Resistance", 2013

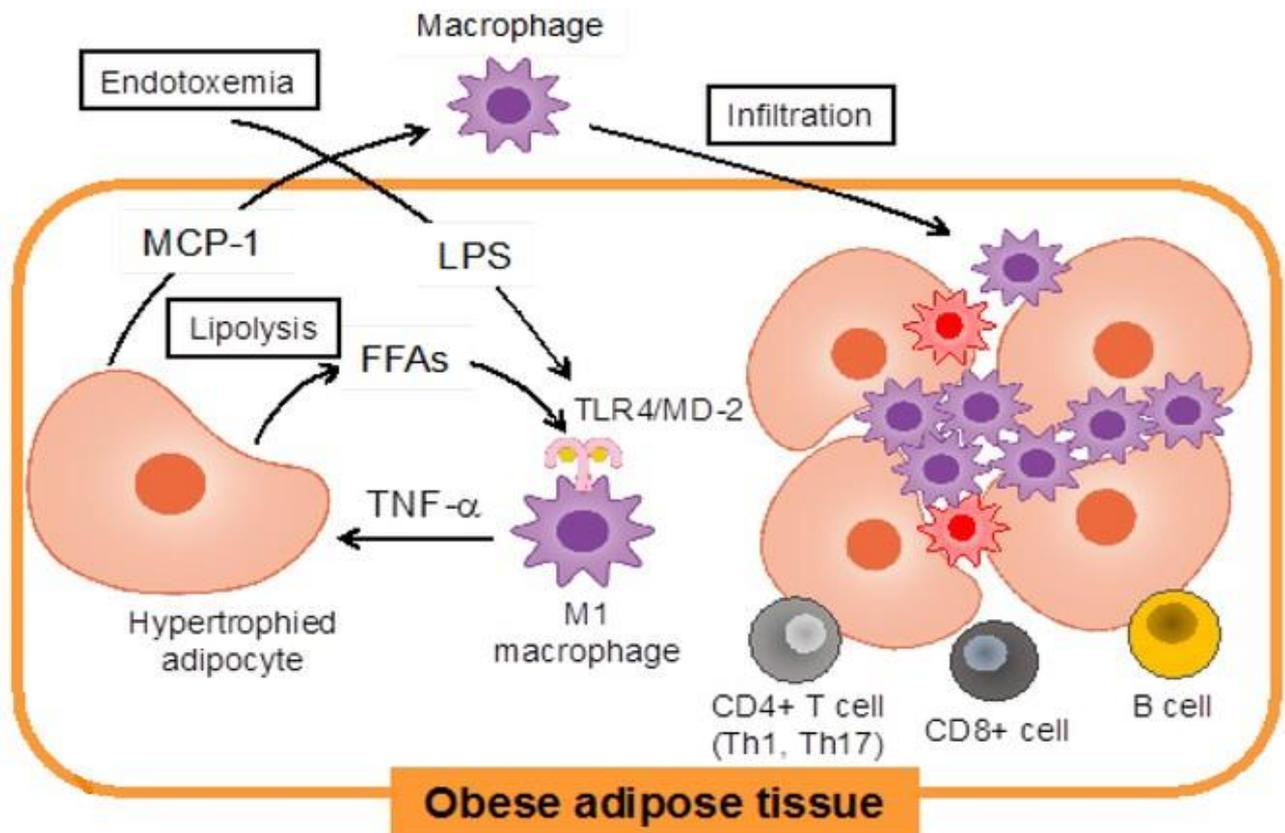


Figura 6: Resolución de la Inflamación: Mecanismos intracelulares de regulación. Tomado de Wang Y. y Huang F. "AGPI ω 3 e Inflamación en la Obesidad: efectos locales y beneficios sistémicos", 2015

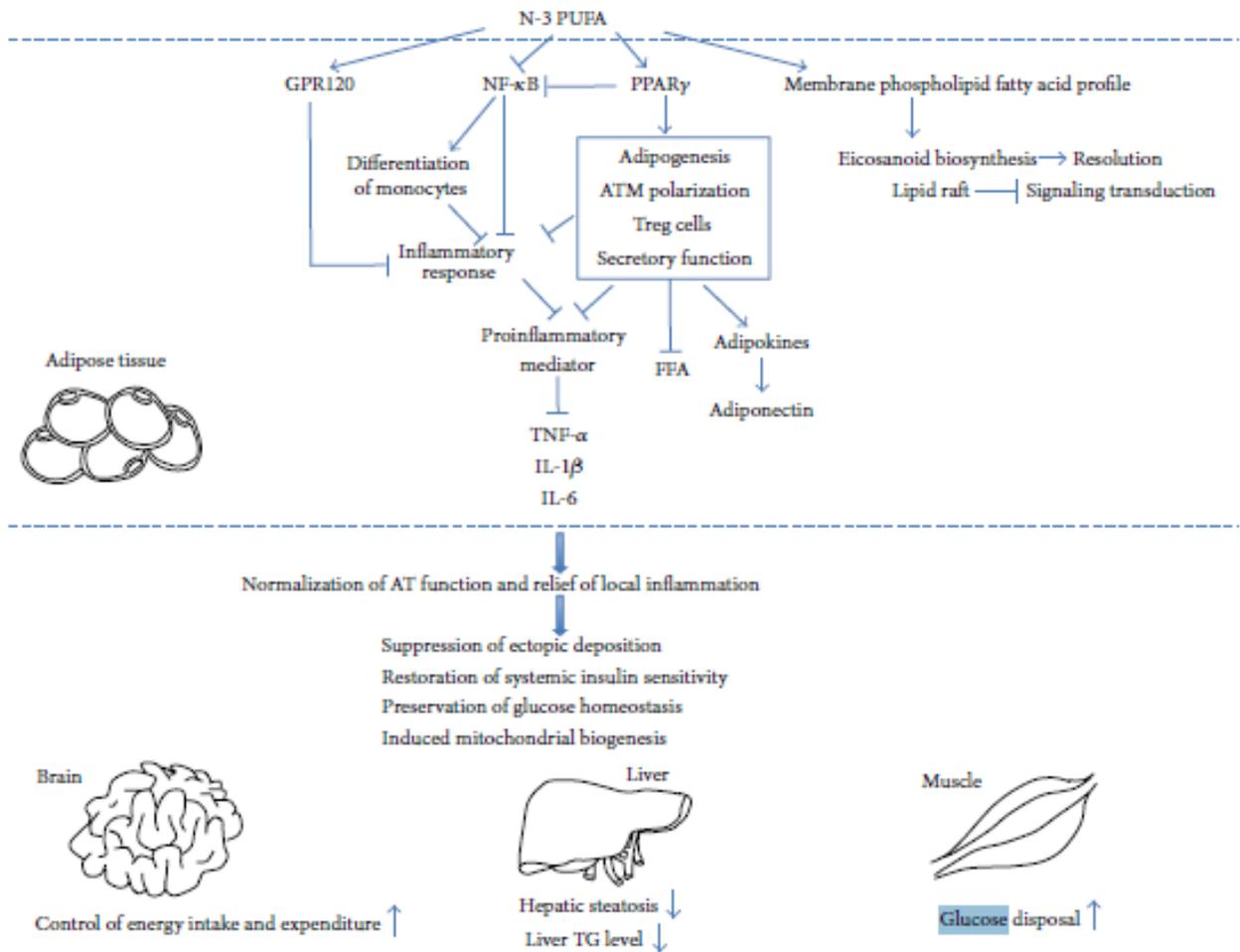


Tabla 1. Principales diferencias entre la inflamación clásica y la ISGB. Tomado de León- Pedroza JI y col. "Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica", 2015.

	INFLAMACIÓN CLÁSICA	ISGB
Duración	Aguda, subaguda	Crónica
Ubicación	Localizada	Sistémica, Tejido Insulinodependiente
Infiltrado celular	Neutrófilos, eosinófilos, células NK, linfocitos T, Mø	Mø, linfocitos T
Citocinas y factores solubles	TNF α , IL1 β , IL-6, ERO	TNF α , IL6, proteína C reactiva, ERO
Activadores	PAMP y DAMP	DAMP metabólicos
Lesión tisular	Presente	Ausente
Patologías Relacionadas	Colitis, Peritonitis, SRIS, etc	Dislipidemia, Aterogénesis, DM2, Hipertensión arterial sistémica

DAMP: patrones moleculares asociados a daño; ERO: especies reactivas del oxígeno; Mø: macrófagos; NK: células asesinas naturales; IL: interleucina; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, TNF: factor de necrosis tumoral.

GLOSARIO

AA: ácido araquidónico

AAL: ácido alfa-linolénico

AGE: ácidos grasos esenciales

AGI: ácidos grasos insaturados

AGL: ácidos grasos libres

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poli-insaturados

AGs: ácidos grasos

AGS: ácidos grasos saturados

AL: ácido linoleico

ALT: alanino-aminotransferasa

Apob100: apolipoproteína B 100

AST: aspartato-aminotransferasa

CC: circunferencia de cintura

CG: cromatografía gaseosa

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño

DC: dieta control

DE: dieta experimental

DHA: ácido docosahexaenoico

DM 2: diabetes mellitus tipo 2

DO: dieta obesogénica

EPA: ácido eicosapentaenoico

IL: interleucina

ISGB: inflamación sistémica de grado bajo

LDL: lipoproteína de baja densidad

Mø: macrófagos

MPT: meses post tratamiento

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PC: peso corporal

PCR: proteína C reactiva

PRR: receptores reconocedores de patrones

STZ: estreptozotocina

TA: tejido adiposo

TAG: triacilglicéridos

TAS: tejido adiposo subcutáneo

TAV: tejido adiposo visceral

TLR2-KO: knockout para TLR 2

TLRs: receptores tipo toll

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

WT: wild type