BENEMÉRITA **U**NIVERSIDAD **A**UTÓNOMA **D**E **P**UEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

“BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN CULTIVO PRIMARIO DE ADIPOCITOS PROVENIENTES DE TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO HUMANO, EN PRESENCIA DE ACEITES COMERCIALES COMESTIBLES CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3”

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

PRESENTA:
KAREN TEXCUCANO AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS:
DC.MAURA CÁRDENAS GARCÍA

ASESORES DE TESIS:
MASS. IRMA ORTEGA SÁNCHEZ
DC. JOSÉ LUIS VENTURA GALLEGOS
DC. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

PUEBLA, PUE. DICIEMBRE 2018

ÍNDICE

1. Resumen I

2. Introducción II

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales 1

3.1.1 Sobrepeso 1

3.1.2 Tejido adiposo 1

3.1.2.1 Tejido adiposo blanco 2

3.1.3 Metabolismo del tejido adiposo 4

3.1.3.1 Metabolismo de carbohidratos 4

3.1.3.2 Metabolismo de lípidos 5

3.1.4 Intervención nutricional en el sobrepeso 6

3.1.4.1 Omega-3 y sobrepeso 7

3.1.4.2 Alimentos que aportan Omega 3 8

3.2 Antecedentes específicos 11

3.2.1 Omega-3, mitocondrias y metabolismo 11

3.2.2 Biogénesis mitocondrial 13

3.2.2 Papel del Omega-3 en la biogénesis mitocondrial 15

4. Planteamiento del problema 22

5. Objetivos 23

5.1. General 23

5.2. Específicos 23

6. Material y Métodos 24

7. Resultados y Discusión 37

8. Conclusiones..... 46

9. Perspectivas a futuro..... 47

10. Bibliografías. 48

11. Anexos 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de tejido adiposo en el organismo 3
Figura 2. Localización anatómica del TAB y TAM..... 3
Figura 3. Metabolismo del Omega 3 7
Figura 4. Control de la calidad mitocondrial..... 13
Figura 5. Síntesis de novo en la biogénesis mitocondrial 14
Figura 6. Mecanismo de acción del Omega 3 21
Figura 7. Esquema de estrategia de trabajo..... 24
Figura 8. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de pepita de uva 37
Figura 9. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de aguacate..... 38
Figura 10. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de oliva..... 38
Figura 11. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de ajonjolí 39
Figura 12. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de chía..... 39
Figura 13. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de linaza 40
Figura 14. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en cápsulas de Omega 3..... 40

Figura 15. µg de proteína de la fracción mitocondrial/célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de cacahuate 41
Figura 16. Porcentaje de incremento de mitocondrias/grupo control..... 42
Figura 17. Emulsión de aceites adicionado a las células (tiempo 0) 43
Figura 18. Ingreso de aceites en células adiposas (8 hras) 44
Figura 19. Presencia de aceite en el interior de las células (12 hras) 44
Figura 20. Presencia de mitocondrias en el adipocita (24 hras) 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de los aceites comerciales comestibles empleados 16
Tabla 2. Contenido de ALA en aceites vegetales 25
Tabla 3. Información de los aceites comerciales comestibles 26
Tabla 4. Contenido de Omega 3 de la cuantificacion obtenida por GC/MS 29
Tabla 5. Composición de ácidos grasos del aceite de pepita de uva 37
Tabla 6. Composición de ácidos grasos del aceite de aguacate 38
Tabla 7. Composición de ácidos grasos del aceite de oliva 38
Tabla 8. Composición de ácidos grasos del aceite de ajonjolí 39
Tabla 9. Composición de ácidos grasos del aceite de chía 39
Tabla 10. Composición de ácidos grasos del aceite de linaza 40
Tabla 11. Composición de ácidos grasos de cápsulas de Omega 3 40
Tabla 12. Composición de ácidos grasos del aceite de cacahuate 41

GLOSARIO

ALA	Ácido α-linolénico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
BM	Biogénesis mitocondrial
CO2	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMEM	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EPA	Ácido eicosapentanoico
GC/MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
IMC	Índice de masa corporal
NRF1	Factor respiratorio nuclear
OMS	Organización mundial de la salud
PBS1x	Solución salina tamponada con fosfato
PGC-1α	Coactivador gamma del receptor activado el proliferador de peroxisomas 1-alfa
PPAR	Receptores de proliferador de peroxisomas activados
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TABg	Tejido adiposo beige
TAM	Tejido adiposo marrón
UCP-1	Proteína desacoplante 1

I. RESUMEN

La suplementación con ácidos grasos poliinsaturado de cadena larga Omega-3, tiene efectos benéficos en los trastornos metabólicos asociados con la acumulacion de tejido adiposo como son el sobrepeso y la obesidad, ya que favorece el gasto energético y la biogénesis mitocondrial (Lorente C. *et al*, 2013; Martínez L. *et al*, 2015). El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de aceites comerciales comestibles con ácidos grasos Omega-3 sobre la inducción de la biogénesis mitocondrial en adipocitos subcutáneos de personas con sobrepeso. La población estuvo conformada por cultivo primario de adipocitos subcutáneos humanos del área abdominal totalmente diferenciados de mujeres con sobrepeso cuyo índice de masa corporal se encontraba entre 28.1 y 29.8 kg/m^2. Los adipocitos fueron cultivados en presencia de cantidades crecientes de aceites comerciales comestibles con ácidos grasos Omega 3 (0 a 25 μL) durante 24 h. Las mitocondrias se cuantificaron empleando verde Janus. Se comparó el efecto de cada uno de los aceites con relación a la biogénesis mitocondrial. Los resultados de este trabajo indicaron que los aceites con mayor efectividad con relación a la biogénesis mitocondrial fueron en primer lugar el aceite de aguacate generando un incremento del casi 400% con relación al grupo control, en segundo lugar el aceite de chia extra virgen, presentando 371%, en tercer lugar el aceite de ajonjolí extra vírgen con un 363% y el aceite de oliva con un 330%. Nuestros resultados sugieren que los aceites comerciales comestibles con ácidos grasos Omega 3 contenido de manera natural y directamente sin cocción en la dieta inducen la biogénesis mitocondrial en los adipocitos subcutáneos de personas con sobrepeso, lo cual modifica el metabolismo de los adipocitos al promover la oxidación de los ácidos grasos y evitar su acumulación.

II. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el sobrepeso ha sido considerado un problema de salud a nivel mundial, generando un incremento en la prevalencia de manera constante año con año; el sobrepeso condiciona a un aumento de masa corporal por la acumulación excesiva de grasa en forma de tejido adiposo blanco que sí continúa genera obesidad y favorece el desarrollo de patologías crónico degenerativas como: diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, entre otros (Gabrielsson B. *et al,* 2003).

Existen diversos factores que causan el sobrepeso, generalmente se genera por una mayor ingesta energética, que gasto, esto puede desencadenar en un mal funcionamiento del tejido adiposo blanco, y una disfunción mitocondrial lo que podría causar hipertrofia en los adipocitos (Tourniaire F. *et al* 2015). Ya que la densidad mitocondrial disminuye, durante el desarrollo del sobrepeso y continúa hasta la obesidad (Heinonen S. *et al*, 2015). Por lo que la estimulación de la biogénesis mitocondrial podría ser una estrategia para favorecer el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco y por ende disminuir el almacenaje de los mismos, esto puede lograrse mediante una acción nutricional que favorezca la generación de más mitocondrias (Bonet M. *et al,* 2013).

Actualmente se ha evidenciado que la inclusión de los ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 (PUFA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentanoico (EPA), poseen efectos benéficos en relación a la adiposidad aumentada que se da en el sobrepeso, ya que favorecen el metabolismo de los adipocitos promoviendo la biogénesis mitocondrial y además disminuyen los procesos de acumulación de lípidos y a la larga evitan la aparición de alteraciones metabólicas (Flachs P. *et al* 2005; Martínez L. *et al,* 2015).

Sin embargo, la capacidad de los PUFA Omega 3 para inducir biogénesis mitocondrial en cultivo primario de adipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo humano que permitan dilusidar a la larga el mecanismo de acción a nivel molecular aún es controvertido (Fernández G. *et al,* 2014, Fernández G. *et al*, 2015), por lo que resulta de nuestro interés determinar si un adipocito de personas con sobrepeso puede incrementar su número de mitocondrias en presencia de aceites comerciales comestibles con Omega -3 y así favorecer la transición de tejido blanco a tejido pardo adiposo.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por acompañarme y guiarme a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y angustia, pero nunca sin perder la fe, y gracias a esto recibí como regalo aprendizajes, experiencias y sobre todo sabiduría.

Y le agradezco muy en especial por las personas que puso en mi camino:

En primer lugar, a mis padres, quienes con su gran apoyo y ayuda constante, llenándome de valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo, por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Gracias a ellos, hoy por hoy, soy quien soy, profesional, personal y académicamente.

Así mismo, quiero agradecerle a mi directora de tesis, la D.C Maura Cárdenas García, por su dedicación, apoyo, esfuerzo y sobre todo su confianza durante estos años por asesorarme y apoyarme en este trabajo de investigación.

Gracias por confiar en mí y brindarme la oportunidad de trabajar con usted.

De igual manera agradezco a mi co-directora, M.A.S.S. Irma Ortega Sánchez, por su motivación y paciencia, que han sido fundamentales para mi formación.

A mi hermana que ha sido una parte muy importante en mi vida, por haber estado en las buenas y en las malas, pero sobre todo por su amor incondicional. Este nuevo logro, es gran parte a ustedes.

A todos ellos, muchas gracias.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 SOBREPESO

El sobrepeso se ha convertido en un problema nutricional de gran prevalencia en el mundo, ya que, en el 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que aproximadamente 1,900 millones de adultos presentaron sobrepeso con un Índice de Masa Corporal (IMC) mayor a >25 kg/m^2 (WHO, 2018).

El sobrepeso se define como el aumento de masa corporal que predispone a la acumulación de grasa, siendo el desbalance energético el principal causante del desarrollo de esta patología lo que tiende a dar como resultado la obesidad que a nivel fisiológico causa un incremento del tejido adiposo blanco (TAB) pudiendo presentarse en dos etapas, inicialmente con una hipertrofia de los adipocitos, es decir que hay un aumento del tamaño de los adipocitos los cuales modifican su metabolismo debido a la acumulación de lípidos en forma de triglicéridos (Ahima R. *et al,* 1996; Muir L. *et al,* 2016) y la segunda conocida como hiperplasia la cual se caracteriza por la multiplicación de los adipocitos, incrementando conforme aumenta el peso (Cappa D, 2012). Tanto la hiperplasia como la hipertrofia inducen a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Reyes M, 2012)

Los trastornos metabólicos que aparecen durante el sobrepeso si continúan, favorecen el desarrollo de patologías que van desde la obesidad pasando por dislipidemias, hasta el desarrollo de Diabetes tipo 2, Resistencia a la Insulina, Síndrome Metabólico, Enfermedades Cardiovasculares, entre otros (Gabrielsson B. *et al,* 2003).

3.1.2 TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo (TA), es considerado el órgano endocrino más grande, siendo de origen mesenquimal; está formado por células especializadas en la acumulación de grasa en forma de triglicéridos mejor conocidos como "adipocitos". Posee receptores hormonales membranales como, por ejemplo: para hormona tiroidea, insulina, glucocorticoides y

noradrenalina (Montalvo C, 2010; Fernández G. *et al*, 2016). Además, produce adipocinas que cumplen diversas funciones fisiológicas que van desde el control de la ingesta, termogénesis, almacenamiento de grasa tanto visceral como subcutánea; algunas de ellas se alteran en estados inflamatorios afectando las funciones del tejido adiposo. El resto del tejido está compuesto por una matriz, constituida por la unión de fibras de colágena tipo III, vasos sanguíneos y linfáticos, células madre mesenquimales de adipocitos, que juntas construyen la fracción vascular del tejido adiposo (Cao Y, 2007; Sanhuez J, 2015) y células inmunes como leucocitos y macrofagos, estos últimos de tipo 1 y 2, expresándose los de tipo 2 en un una persona con normopeso, sin embargo, los de tipo 1 se relacionan con estados pro-inflamatorios como el sobrepeso y la obesidad (Rodríguez C. P. et al 2017).

En el organismo los lípidos se almacenan en tres tipos de tejido adiposo, clasificándose en tejido adiposo blanco (TAB), tejido adiposo marrón (TAM) y tejido adiposo beige (TABg) de acuerdo a su estructura, localizacion y función (Figura 1) (Esteve, 2014; Sánchez J. *et al*, 2016).

3.1.2.1 TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco (TAB) es el tejido donde la energía se almacena en el organismo, su función principal es brindar protección a los órganos vitales. Por ser el tejido más abundante se le considera el mayor reservorio energético. Está compuesto por adipocitos uniloculares, es decir, que cada célula contiene una sola vacuola con triglicéridos que ocupa entre 70 y 90% del citoplasma, desplazando a los organelos incluyendo el núcleo hacia la membrana plasmática (Esteve, 2014). Se caracteriza por poseer adipocitos de color blanco o amarillo, su tamaño suele oscilar entre 10-120 µm de diámetro (Esteve, 2014; Smitka K, 2015).

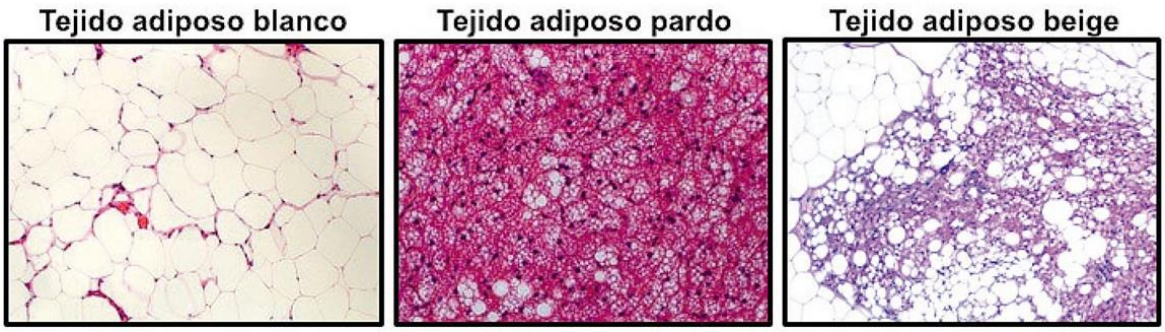


***Figura 1 Tipos de tejido adiposo en el organismo**. La primera imagen muestra vacuolas grandes de grasa pertenecientes al TAB, en la segunda se observan mitocondrias en gran cantidad perteneciente al TAM, y en la última se muestra el tejido adiposo beige en un proceso de transición de adipocitos blancos a marrones (Ezquerro S, 2016).*

Las células precursoras que dan lugar a este tejido se les conoce como preadipocitos, generados por las células madre adiposas, que se encargan del mantenimiento, renovación y expansión del mismo, ya sea en estado de energía normal o en exceso (Sánchez J. *et al*, 2016). Los mayores depósitos se localizan a nivel intra-abdominal, protegiendo los órganos más importantes; alrededor del omento (omental), intestino (mesentérico) y de las áreas perirrenales (retroperitoneal), también puede localizarse a nivel subcutáneo principalmente a nivel de los glúteos, muslos y abdomen. Existen otras áreas donde se puede identificar, a nivel pericardial perivascular o periarterial, retroorbital, intramuscular y sobre todo en la parte facial (Esteve, 2014) (Figura 2).

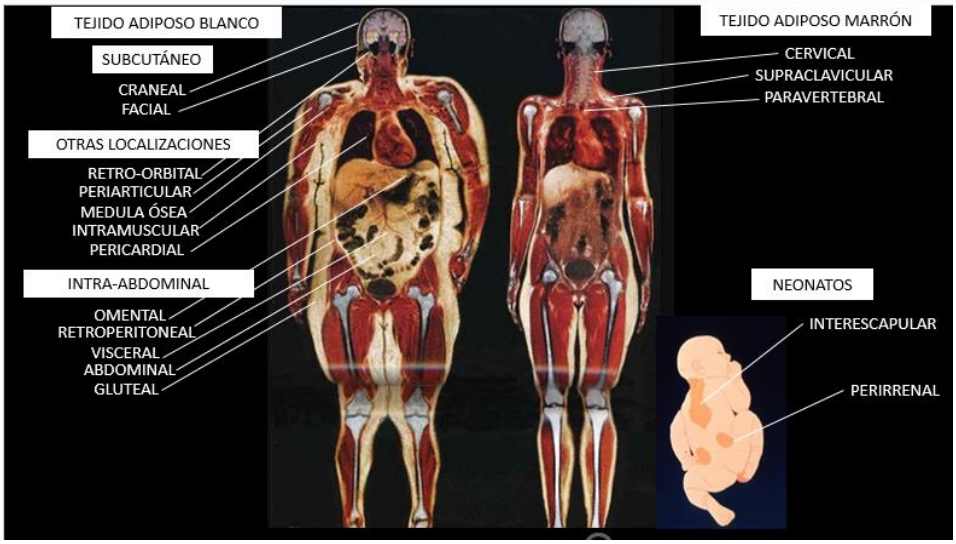


***Figura 2 Localización anatómica del TAB y TAM.** Se observa tanto en la etapa adulta como en neonatos, en este último solo se aprecia el desarrollo de tejido adiposo marrón ya que conforme la edad avanza este tipo de tejido va disminuyendo, siendo predominante el tejido adiposo blanco. Modificado de (Esteve, 2014)*

Entre las hormonas que produce este tejido se encuentra la leptina, la cual se encarga de regular la producción de otras adipocinas en forma autocrina, y a través de ésta, los adipocitos intervienen en diversas funciones que van desde la regulación del apetito, hasta la regulación de la respuesta inmune (Sánchez J. *et al*, 2016).

El segundo tipo de tejido es conocido como "tejido pardo adiposo" ó "tejido adiposo marrón" (TAM), el cual se caracteriza por tener adipocitos que contiene una gran cantidad de pequeñas vacuolas lipídicas distribuidas en todo el citoplasma estando rodeadas por mitocondrias las cuales son las responsables de conferirle el color a los adipocitos. Se ubican en la zona interescapular, axilar, perirrenal y cervical, principalmente en los neonatos (Figura 2). Interviene en funciones metabólicas, como en la regulación de la termogénesis y del balance energético, por la gran cantidad de mitocondrias que contiene. Sin embargo, su función más importante es metabolizar los ácidos grasos produciendo calor (Montalvo C, 2010; Esteve, 2014).

El tercer tipo de tejido es el "tejido adiposo beige" (TABg), se localizan en la región inguinal, se origina a partir del TAB el cual a su vez posee características similares a los adipocitos marrones (Sánchez J. *et al*, 2016). Se desarrolla a partir del proceso conocido como pardeamiento de adipocitos en el TAB. La inducción de esta diferenciación representa una nueva estrategia terapéutica que beneficiará el tratamiento contra el sobrepeso y la posible disminución del tejido adiposo blanco, debido a que estos adipocitos son considerados productores de adiponectina que a su vez favorecerán la termogénesis.

3.1.3 METABOLISMO EN EL TEJIDO ADIPOSO

3.1.3.1 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

A partir de la glucosa se lleva a cabo el metabolismo de los carbohidratos mediante tres rutas: glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria/fosforilación oxidativa.

La primera ruta es la glucólisis, considerada un proceso anaeróbico es decir no requiere de oxígeno para poder llevarlo a cabo, este proceso se efectúa en el citoplasma de todas las células. Como resultado de la glucólisis, por cada molécula de ATP, se producen dos moléculas de ácido pirúvico (Patton K, 2017). Las moléculas de ácido pirúvico entran por

transporte activo en la mitocondria donde el complejo de la Piruvato Deshidrogenasa las transforma en Acetil-CoA, dando lugar a las otras dos rutas metabólicas que efectúan los organismos aerobios.

El ciclo del ácido cítrico, de los ácidos tricarboxilicos o Ciclo de Krebs, se inicia a partir de Acetil CoA que es el punto de convergencia en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Conforme se va descomponiendo esta molécula de dos carbonos en dos de dióxido de carbono con la ayuda de enzimas localizadas en la mitocondria, el ácido cítrico va a liberar electrones de alta energía (Patton K, 2017). La tercera vía metabólica se efectúa en la parte interna de la mitocondria principalmente en las crestas, se va a encargar de transferir la energía de los electrones generados por las vías anteriores a moléculas de ATP. La mitocondria puede generar hasta 36 moléculas de ATP (Patton K, 2017).

En el adipocito la glucosa también da lugar a glicerol 3- fosfato, por el exceso energético que se genera en el mismo, el glicerol 3-fosfato es precursor de triglicéridos que se almacenan en los adipocitos. Aproximadamente el 20-25% de la glucosa que es absorbida por los adipocitos, se usa para la síntesis y almacenamiento de los triglicéridos (Iwata S. *et al*, 1998).

3.1.3.2 METABOLISMO DE LÍPIDOS

Dentro de la mitocondria se efectúa el catabolismo de los ácidos grasos, a través de la β-oxidación, los ácidos grasos se catabolizan a acetil-coenzima A (acetil-CoA), la cual se transfiere al ciclo de Krebs, donde se oxida a dióxido de carbono y agua, liberando energía para la síntesis de ATP. Las enzimas que participan en la β-oxidación se encuentran ubicadas principalmente en las membranas internas y la matriz de las mitocondrias (Fock K, 2013).

El proceso inicia con la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria unidos a la coenzima A en la membrana mitocondrial externa, lo que supone su activación. Una vez activados, se transfiere a la carnitina catalizado por la carnitina-palmitoiltransferasa 1 y transportados como derivados de la carnitina hasta la parte interna de la membrana mitocondrial. Una vez allí, se produce la reacción inversa, con formación de nuevo de carnitina y acilCoA (reacción catalizada por la carnitina-palmitoiltransferasa 2). Se genera acetil-CoA, como resultado de

la β-oxidación la cual entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la respiración celular y la producción de ATP. (Bugianesi E. *et al*. 2005)

La síntesis de los triglicéridos se da a partir de acil-CoA y glicerol-3-fosfato. Los acil-CoA provienen de los ácidos grasos que fueron liberados en la lipólisis de triglicéridos ya existentes y de los incorporados al tejido desde la sangre, ambos por acción de la acil-CoA sintetasa. En cuanto al glicerol-3-fosfato, que se obtiene por la lipólisis de las lipoproteínas no se usa para la formación de triglicéridos, debido a que la "quinasa" correspondiente se expresa en poca cantidad en el TA, por lo que se dirige hacia el plasma y posteriormente se transporta a otros tejidos donde se empleará. Los triglicéridos a nivel de tejido adiposo van a ser hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol (Fock K, 2013).

El ácido fosfatídico es el iniciador de la síntesis de fosfolípidos, se sintetiza en el retículo endoplásmico y en la membrana mitocondrial externa, esto a partir del glicerol-fosfato y de los ácidos grasos. El primero es resultado de la dihidroxiacetona de la glucólisis y del glicerol (en menor medida). Tambié son necesarios algunos alcoholes, entre los que cabe destacar la colina procedente de la dieta. La pérdida del fosfato del ácido fosfatídico origina diacilglicerol (DAG), ésta se utiliza para la síntesis de fosfolípidos así como de triglicéridos. La síntesis de fosfolípidos requiere de este fosfato y de un alcohol. (Gil, A. 2012).

3.1.4 INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN EL SOBREPESO

La intervención nutricional en el tratamiento del sobrepeso es la clave del adecuado funcionamiento del tejido adiposo en el metabolismo, beneficia a las personas que presentan exceso de peso, con la inducción de cambios en el estilo de vida, principalmente en la alimentación. El nutriólogo clínico es el encargado de realizar la historia clínica del paciente la cual nos va a proporcionar datos como antecedentes heredofamiliares y patológicos (Vilallonga L. *et al*, 2008) para posteriormente evaluar el estado nutricio a través del Índice de Masa Corporal (IMC), cabe mencionar que este parámetro presenta limitaciones porque no arroja la composición corporal total, por esta razón se recomienda realizar antropométria, que nos permite conocer el porcentaje de masa grasa, masa magra y nos permite evaluar la grasa a nivel abdominal, antes durante y después del tratamiento nutricio considerando también los puntos de corte, el peso y pliegues cutáneos (Vilallonga L. *et al*, 2008).

Adicionalmente se solicita el recordatorio de 24 horas y la frecuencia de consumo de alimentos, estos nos aportan detalles sobre la calidad de la dieta, selección de alimentos, porciones consumidas y los horarios establecidos, además permite calcular un promedio de la ingesta calórica diaria que el paciente consume. Finalmente se indica el tratamiento adecuado, con el objetivo de disminuir el peso, mediante una dieta individualizada y personalizada de tipo hipocalórica, principalmente baja en carbohidratos, que va de 1,000 a 1,200 kcal/día en mujeres y de 1,500 a 2,000 kcal en hombres (Vilallonga L. *et al*, 2008; Gargallo M. *et al*, 2012).

3.1.4.1 OMEGA-3 Y SOBREPESO

Los ácidos grasos poliinsaturados también regulan el metabolismo de los lípidos, los Omega-3 y los Omega-6 son las dos clases principales de los PUFA, deben ser aportados por la dieta, debido a que no pueden ser sintetizados por el organismo. El principal precursor de Omega-3 es el ácido α-linolenico el cual a través de la participación de enzimas como la elongasa y desaturasa se metaboliza a ácido eicosapentanoico (EPA) y en menor cantidad a ácido docosahexanoico (DHA) (Figura 3) (Katz M. *et al*, 2013).

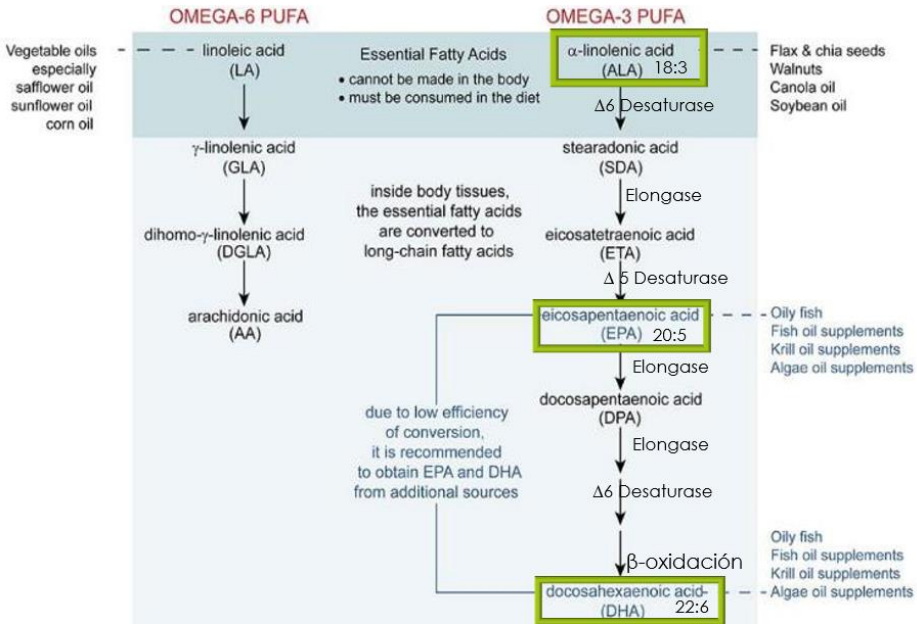


Figura 3 Metabolismo del Omega-3. Se observan las enzimas que participan en esta vía y las conversiones que sufre con la intervención de las mismas. (Simopoulos, A.P. 2016)

El Omega- 3 participa en el metabolismo en general, es fundamental para algunos procesos del organismo como: generar energía, actúan como reguladores metabólicos en los sistemas cardiovasculares, inmune, pulmonar, preservan la funcionalidad de las membranas celulares y participan en procesos de transcripción genética (Cabezas C. *et al,* 2016), además de resultar eficaz en el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas no transmisibles (Simopoulos A. *et al,* 2016), impidiendo la ganancia de peso y de adiposidad, mejorando la función mitocondrial, reduciendo la acumulación de grasa y mejorando los perfiles metabólicos como la tolerancia a la glucosa y las concentraciones de triglicéridos. Un ejemplo de ello fue un estudio que se llevó a cabo en mujeres con tejido adiposo aumentado que consumieron una suplementación con Omega-3, específicamente 2 gr/kg/dia, presentaron una reducción significativa de su IMC, masa grasa y peso, durante 3 meses, esto en conjunto con un régimen dietético y de ejercicio (González A, 2013).

Dentro de la terapia nutricional para tratar el sobrepeso se ha considerado un reemplazo de ingesta de grasas saturadas por grasas saludables (insaturadas) principalmente Omega-3. La NOM-037-SSA2-2012 recomienda entre 2 y 3 g semanales de ácidos grasos Omega-3, por los beneficios ya comentados (Ortiz G, *et al,* 2013). Por lo que el Omega-3, se considera un candidato terapéutico nutricional ideal para el tratamiento o prevención de patologías donde la inflamación juega un rol principal, como por ejemplo en el aumento de peso y procesos de hipertrofia e hiperplasia causados por la obesidad lo cual causa a la vez la disfunción mitocondrial (Valenzuela R. *et al,* 2011; Valero T, 2014).

3.1.4.2 ALIMENTOS QUE APORTAN OMEGA-3

El Omega-3 se adquiere a través de la dieta por diversas fuentes animales como pescados de aguas frías por ejemplo el salmón, atún, sardina, arenque, hígado de bacalao entre otros, también lo podemos adquirir a través de fuentes vegetales como aguacate, verdolaga, lechuga, espinaca, brócoli etc., de nueces, cacahuates y semillas como almendras, chía y lino y de aceites vegetales como los aceites comestibles que se comen en crudo es decir que pueden consumirse directamente del envance a temperatura ambiente, como el aceite de linaza, aguacate, ajonjolí, chía, oliva etc (Castro M, 2002; González H, 2016). La inclusión de estos aceites aportan beneficios frente a algunas patologías como enfermedades

cardiovasculares, procesos inflamatorios, sobrepeso y obesidad que a su vez se han relacionado con la función mitocondrial (Fock *et al*, 2013). A continuación se comentan algunos estudios que indican los beneficios que aporta la inclusión de aceites vegetales y cápsulas de Omega-3 de salmón, que además fueron empleados en nuestra investigación.

El aceite de aguacate posee una cantidad considerable de antioxidantes y otros elementos los cuales han contribuido a mejorias en la salud. En estudios tantos en humanos como en modelos animales han demostrados que el consumo de éste ayuda a reducir el riesgo de presentar diabetes, así como de normalizar los niveles de colesterol y finalmente ayuda al control de peso (Carvajal O. *et al*, 2014).

El aceite de sésamo o mejor conocido como ajonjolí, es considerado un suplemento nutricional debido a que contiene ácidos grasos funcionales, como el ácido oleico y el α-linolénico. En un estudio llevado a cabo con este aceite se informó que su ingesta se relaciona con la mejora de la hipercolesterolemia e hiperglucemia. Sin embargo, en cuanto al estudio de perfiles lípidos y expresión de genes asociados a la obesidad aún son escasos (Pan J. *et al* 2015).

En un estudio llevado a cabo en persona con obesidad en el año 2014, determinaron que la ingesta de aceite de cacahuate empleado en crudo y en conjunto con una dieta hipocalórica condujo a una mejora de la composición corporal, así como a una mayor oxidación de grasa, durante 6 meses, además de que consideran que los cacahuates tienen un alto valor de saciedad, por su rica fuente en fibra y proteína (Duarte A. *et al*, 2014)

El aceite de chía es uno de los aceites que presentan propiedades antioxidantes, quizá por la presencia de ácido alfa-linolénico (ALA), polifenoles entres otros compuestos. Por lo que su ingesta se relaciona con la mejoría en el sistema de defensa antioxidante en ratas obesas que fueron inducida por la dieta en este estudio, protegiendo contra el daño oxidativo celular y las enfermedades que son causadas por la obesidad (Silva R. *et al*, 2015)

El aceite de oliva hoy en día es fundamental para la dieta mediterránea, ya que posee altas cantidades de ácidos grasos monoinsaturados así como de otros componentes. Trae consigo

efectos benéficos en la prevención, desarrollo y progresión de la Diabetes mellitus tipo 2, sin embargo, aún faltan estudios que comprueben lo mencionado anteriormente.

El aceite de pepita de uva es uno de los aceites comestibles que aportan beneficios a la salud de acuerdo a las propiedades que posee, que van desde cardioprotectoras hasta antiinflamatorias entre otras. Esto se debe a los componentes que posee, sin embargo, cabe destacar que se requiere de una gran cantidad de aceite para poder lograr estos efectos, por lo que necesitan más estudios de estos efectos y del uso como adyuvante en el tratamiento de enfermedades crónicas (Garavaglia J, 2016).

En el caso de las cápsulas de Omega-3 de salmón, en estudios realizados en la composición corporal, observaron mejorías en cuanto a la relación cintura- cadera, sin embargo, no fue detectado algún beneficio antiobesidad en personas que presentaron sobrepeso o bien los obesos. Por lo que se concluyó en este estudio que la suplementación de éste es más efectivo en la prevención en el aumento de peso en lugar de ayudar a una pérdida significativa de peso (Shichun D. *et al*, 2015).

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

3.2.1 OMEGA-3, MITOCONDRIA Y METABOLISMO

Las mitocondrias son los organelos en donde se efectúa el metabolismo aerobio como la fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos, para producción de ATP y la homeostasis energética, participan en las señalización intracelular alterando la homeostasis del calcio ya que se ve alterada la actividad de la bomba de calcio en la membrana plasmática lo que hace que el calcio aumente y cause daños en el interior de la mitocondria, también sufre daño oxidativo por la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS), siendo estos los que contribuyen a la aparición de algunas patologías. También dentro de la mitocondria llega a darse el proceso de apoptosis, es decir de muerte celular causada por el daño oxidativo alterando a la vez su función. Por ello se consideran fundamentales en algunos procesos alterados en diversas enfermedades (Luna P. *et al*, 2014).

El recambio mitocondrial es un proceso que se da con el objetivo de restituir a las mitocondrias que llegan a dañarse o envejecer, perdiendo su función y estructura, degradándose por la misma mitocondria por medio de autofagia, cuando ya no pueden ser reparadas, la cual más adelante se comenta a detalle (Luna P. *et al*, 2014).

El daño mitocondrial puede llegar a causar una acumulación de lípidos. El papel de la nutrición es fundamental para el manejo de enfermedades relacionadas a los efectos y la función mitocondrial como la DM2, enfermedad arterial coronaria entre otras (Surendra S, 2016). Uno de los componentes nutricionales que pueden ayudar al manejo de las enfermedades mitocondrias es la suplementación con ácidos grasos Omega-3, debido a que influye de forma positiva en los perfiles lipídicos y en el metabolismo de los mismo que se efectúa en las mitocondrias de los organismos aerobios, proporcionando protección contra las disfunciones mitocondriales, por un lado tanto el EPA como el DHA se incorporan a las membranas plasmáticas al igual que en la membrana mitocondrial (Jeromson S y Hunter D, 2014).

Este tipo de suplementación producen la inhibición de la lipogénesis y aumentan de la β-oxidación, tanto en la mitocondria como en los peroxisomas. Los peroxisomas pueden oxidar

los ácidos grasos poliinsaturados, es también considerada una β-oxidación a diferencia que aquí no es necesaria la carnitina para la entrada de los ácidos grasos. El aumento de la oxidación peroxisómica se lleva a cabo a través de la inducción de diferentes enzimas mediado por el receptor activado por proliferadores de los peroxisomas (PPAR). A diferencia de la oxidación mitocondrial, la oxidación en los peroxisomas no sirve para generar ATP, sino que se disipa en forma de calor (Gil A, 2012). A continuación, se describen algunos estudios donde se muestran el papel de esta suplementación en relación a la función mitocondrial.

En investigaciones se ha probado que el consumo de Omega-3 trae beneficios a pacientes que presentan diversas enfermedades crónico- degenerativas no transmisibles, poseen acción antiinflamatoria en procesos metabólicos, intervienen en la oxidación de grasas y mejoran la función mitocondrial. En animales de laboratorio se ha comprobado que la suplementación tanto de DHA como de EPA mejoran parámetros metabólicos, como: la glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol etc. (Lepretti M. *et al*, 2018). En individuos sensibles a la insulina, hay una variación en diversos parámetros mitocondriales como la estructura, función y el número, lo que sugiere que la disfunción mitocondrial contribuye a la resistencia a la insulina, es ahí donde se considera que la inducción a la biogénesis mitocondrial podría tener la posibilidad de mejorar la función de la mitocondria (McQuaid S. *et al* 2011; Valenzuela R. *et al*, 2011). Además de esto influyen en la disminución en el tamaño de los adipocitos y genera un aumento en la β-oxidación. (Castellanos L *et al*, 2015).

Como se mencionó existe una relación entre Omega-3 con la mitocondria, debido a que están implicadas en el metabolismo lipídico. Existen datos que respaldan dicha evidencia de que la ingesta de DHA presenta efectos sobre la composición de los fosfolípidos de la membrana mitocondrial y la función de esta, modulando la expresión de genes que se relacionan con el control de la BM (Afshordel S. *et al*, 2015).

3.2.2 BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial es un evento complejo que se define como el proceso a través del cual las células aumentan su tamaño, número y masa mitocondrial de forma individual a través de la fisión de mitocondrias preexistentes. Se da mediante dos procesos, el primero en el mantenimiento o recambio mitocondrial, siendo importante en la restitución de las mitocondrias dañadas. El control de la calidad mitocondrial se inicia cuando la célula revisa la estructura y función de las mitocondrias, debido a que pueden llegar a sufrir una alteración en su función, es decir daño oxidativo causado por el exceso de radicales libres o por envejecimiento normal, ocasionando una disfunción de la misma, si el daño continúa las mitocondrias dañadas no pueden ser reparadas, por lo que son degradadas por la misma mitocondria, por "Autofagia", sin embargo, las que aún pueden ser "reparadas" se reciclan para hacerlas funcionales nuevamente (Figura 4) (Zorzano A. *et al*, 2012).

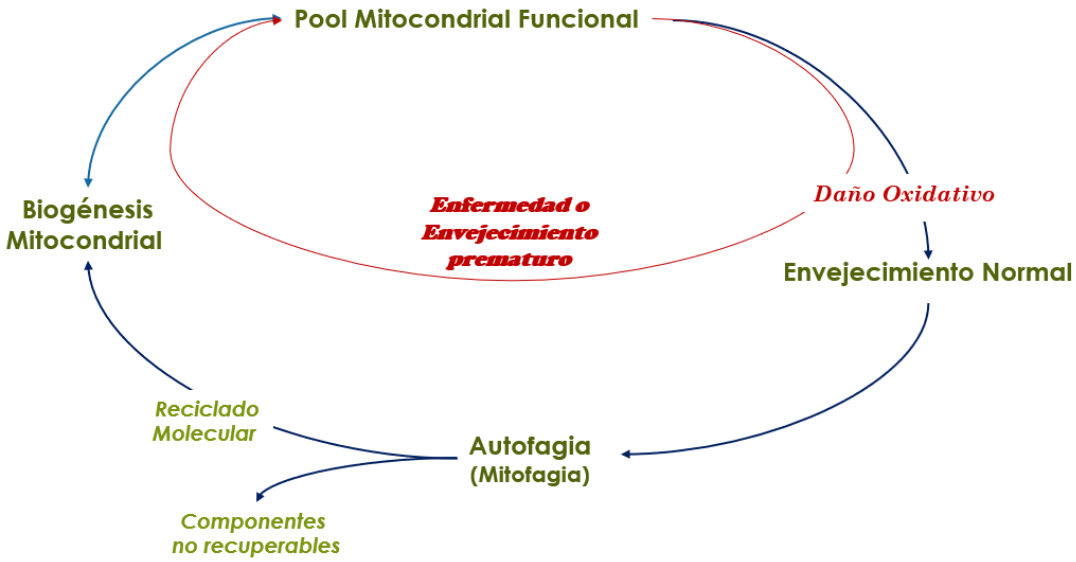


Figura 4 Control de la calidad mitocondrial. Proceso que se lleva a cabo en la restitución de las mitocondrias dañadas y las reparadas (Zorzano A. et al 2012).

El segundo proceso de biogénesis mitocondrial es mediante la síntesis de novo, que da lugar a nuevas mitocondrias, activándose en respuesta a estímulos externos como el estrés térmico (frío), restricción calórica, demanda energética, la división y diferenciación celular (Luna P. et al, 2014) con el fin de dar lugar a dos mitocondrias idénticas, por ello se considera importante este proceso para un adecuado funcionamiento celular, regulación de procesos inflamatorios y apoptóticos, incrementando la capacidad de producción de ATP y generación

de calor. Y al incrementar la biogénesis mitocondrial da lugar a un cambio en su fenotipo, es decir, que los adipocitos pertenecientes al TAB podrían verse como adipocitos beige por la cantidad de mitocondrias generadas por este proceso (Figura 5). (Luna P. *et al*, 2014; Valero T, 2014).

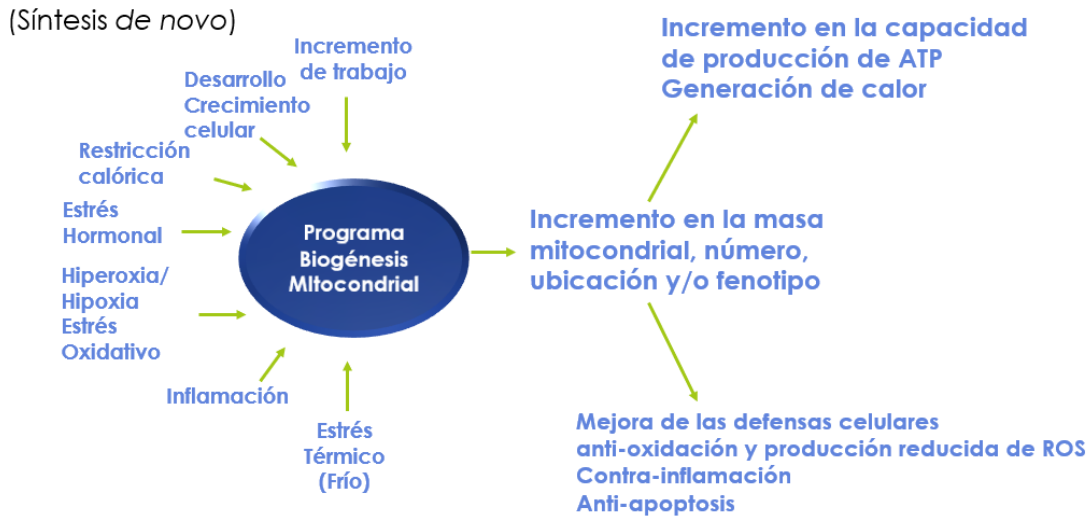


Figura 5 Síntesis de novo en la biogénesis mitocondrial. Estímulos externos que intervienen en la biogénesis mitocondrial (Luna P. *et al*, 2014)

Como se discutió la actividad física puede inducir la biogénesis mitocondrial, sin embargo, va a depender del tipo, intensidad y duración del ejercicio. El de tipo prolongado y de alta intensidad conduce a una perdida pronunciada de masa grasa, o bien puede inducir cambios en depósitos de grasa localizados visceral o gluteofemoral, a su vez se ha mostrado que mejora la sensibilidad a la insulina (Stinkens R. *et al*, 2018).

La restricción calórica se ha asociado a la mejora de la biosíntesis de ácidos grasos y a la vez activa la función mitocondrial en el tejido adiposo blanco, lo que da como resultado una remodelación metabólica. Esta restricción regula el coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1α (PGC-1α) siendo este coactivador indispensable en la biogénesis mitocondrial, lo que produce efectos benéficos (Kobayashi M. *et al*, 2018). También la biogénesis mitocondrial puede ser manipulada farmacológicamente, con el fin de tratar varias enfermedades crónico-degenerativas, y neurodegenerativas como diabetes

mellitus y enfermedad de Alzheimer por ejemplo. El uso de tiazolidinedionas, metformina y benzafibrato se usa para activar el eje PPAR-PGC-1α y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que sugiere un efecto en la biogénesis mitocondrial. Otras estrategias incluyen la adición de suplementos antioxidantes como la vitamina C, vitamina E, piruvato de sodio y ácido α-lipoico (Valero T, 2014).

La BM a su vez va a requerir la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares: el nuclear y el mitocondrial; constando de dos procesos que son la proliferación mitocondrial y la diferenciación. El genoma nuclear se va a encargar de codificar la mayoría de las proteínas mitocondriales, mientras que el genoma mitocondrial codificará para 13 subunidades de proteínas de los complejos respiratorios mitocondriales (Vissers D. *et al*, 2013). Para que se lleve a cabo el proceso de biogénesis mitocondrial se requiere de reguladores que pertenecen a la familia de coactivadores transcripcionales activados por el PPARγ y el coactivador 1α del PPARγ mejor conocido como "PGC-1α" La PGC-1α se considera principal regulador de biogénesis mitocondrial, la inducción de ésta aumenta la tasa metabólica a través del incremento de la expresión de las proteínas desacoplantes mitocondriales (Vissers D. *et al*, 2013). Además, es una de las más importantes por su papel como activadora en adipocitos marrones y se considerada como inductor del metabolismo oxidativo mitocondrial. (Vissers D. *et al*, 2013).

Sin embargo, existen otras proteínas que pertenecen a la misma familia, la PGC-1 β posee la función de inducir un aumento en la capacidad oxidativa mitocondrial y a su vez mediante estímulos externos como, la actividad física, el ayuno y la exposición al frío aceleran la expresión y actividad de PGC-1α, lo que podría favorecer la biogénesis mitocondrial (Gabrielsson B. *et al*, 2003).

3.2.3 PAPEL DEL OMEGA-3 EN LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La familia de Omega-3 tiene un papel importante en el proceso de biogénesis mitocondrial, ya que se encarga de triplicar la expresión de los genes que codifican factores reguladores que controlan dicho proceso. Existen estudios que muestran el efecto que tiene cada ácido

grasos de la familia Omega-3 con relación a la biogénesis mitocondrial. A continuación, se describen en la tabla 1 el ácido graso y el papel que desempeña en la biogénesis mitocondrial.

Tabla 1. Estudios de ácidos grasos Omega-3 en la relación a la biogénesis mitocondrial

ÁCIDO GRASO	AUTOR (AÑO)	RESUMEN
EPA	Laiglesia L.M.*et al*, 2016	Presenta efectos benéficos en trastornos metabólicos asociados con la obesidad. En adipocitos se observó un aumento en el contenido mitocondrial, promoviendo la activación de reguladores involucrados en el proceso de BM como la PGC-1α. Además, indujo la expresión de genes que tripifican adipocitos beige como por ejemplo la UCP1. Por lo que indica que el EPA induce a una remodelación del metabolismo de los lípidos, promoviendo la oxidación de ácidos grasos, previendo el almacenamiento de grasas, potenciando la BM y los marcadores de color beige en adipocitos subcutáneos humanos en personas que presentan sobrepeso
	Vaughan R. *et al*, 2012	Induce una remodelación del metabolismo evitando el almacenaje de grasas y promueve la oxidación de los ácidos grasos, biogénesis mitocondrial y la diferenciación de los adipocitos blancos al beige.

DHA	Afshordel S. *et al.* 2015	Se ha relacionado con las mitocondrias, y con la fluidez de la membrana ya que los datos in vitro evidencian los efectos que tienen sobre la composición de fosfolípidos de la membrana mitocondrial y por ende la función de esta. Trabaja en conjunto con el EPA, ambos promoviendo la biogénesis mitocondrial y modulación de la expresión de genes controlan el metabolismo energético y la producción de ATP, principalmente independientes de sus efectos en la composición de la membrana
	Soon M. *et al*. 2016	Poseen efectos hipolipidémicos, sensibilidad a la insulina mejorada y oxidación de ácidos grasos, también codifican factores reguladores del metabolismo oxidativo en el tejido adiposo
EPA y DHA	Nagy K, 2017	EPA como el DHA se encargan de regular la baja expresión de genes relacionados con la inflamación a través del PPAR α/γ, receptor relacionado con el metabolismo de los lípidos el cual estimula la β-oxidación, y a su vez disminuye los niveles circulantes de triglicéridos y ácidos grasos libres lo que previene la hipertrofia e hiperplasia, además estos receptores son activadores de adipocitos marrones, lo que se relaciona con la biogénesis mitocondrial.

ÁCIDO α-LINOLÉNICO (ALA)	Zhou X. *et al,2015*	Se relaciona con la reducción de masa grasa aumentando el contenido de PGC1α, UCP2, nrf1 en la grasa del epidídimo, sin embargo, estos efectos se observan en menor proporción en la grasa blanca inguinal. En un estudio llevado a cabo en roedores, el tratamiento con ALA aumentó la expresión de PPAR α, siendo este el principal promotor de la oxidación de los lípidos mitocondriales. Además, mostraron que el ALA mejora la función del tejido adiposo, sin embargo, requiere de la proteína quinasa "AMPK" la cual tiene un papel en la homeostasis energética del tejido adiposo blanco en términos de almacenamiento y liberación de triglicéridos, biogénesis mitocondrial y capacidad oxidativa, siendo necesaria para potenciar los efectos de este acido grasos sobre el metabolismo de los lípidos.
	Gabrielsson B. *et al,* 2003	Tienen relación con la homeostasis energética, haciendo énfasis en la acumulación de grasa debido a que controlan de forma activa el recambio de lípidos, produciendo a su vez ATP y sustratos para el metabolismo, también se encargan de la formación de nuevos adipocitos principalmente en la fase de diferenciación hasta la maduración de estos.
	Flachs P. *et al*, 2005	La inclusión de los PUFA Omega-3, ayudan a la potenciación de la β-oxidación y la regulación de la biogénesis mitocondrial de forma positiva, ya que se asoció que genera una triple estimulación de genes que codifican factores que regulan la BM, tal es el caso del activador del proliferador de peroxisoma, activador gamma 1 alfa (PGC1α) –y el factor respiratorio nuclear (Nrf1)

OMEGA-3	Kopecky J. *et al,* 2009	En un estudio en ratas alimentadas con una dieta donde se les adicionó Omega-3, observaron que contrarrestaban tanto el desarrollo de la obesidad como el de la resistencia a la insulina. Por lo que sugirieron que en humanos la suplementación de estos podría reducir la acumulación de grasa pudiendo mejorar el metabolismo de la glucosa. También encontraron que mediante la administración de estos ácidos grasos se suprimía el proceso de hipertrofia e hiperplasia, mejorando la inflamación del tejido adiposo
	Martínez L. *et al,* 2015	Mostraron que Omega-3 (de origen marino), modulan el número de adipocitos regulando su proliferación y diferenciación. Además de que se encargan de la movilización de grasa de los adipocitos y de la regulación de las vías que controlan el almacenamiento de esta. Los Omega-3 a su vez disminuyen los procesos de acumulación de lípidos, y favorecen el metabolismo de los adipocitos promoviendo la BM, y la oxidación de los ácidos grasos.

En la fase de diferenciación de los preadipocitos, las mitocondrias requieren generar y mantener el ATP para poder realizar los procesos que consumen energía, mientras mantiene la actividad celular normal. Se considera relevante este proceso debido a que si existe disfunción mitocondrial podría llevar a un inadecuado rendimiento de algunos tejidos primarios como es el hígado, el músculo esquelético y cardiaco, así como el tejido adiposo. Esta disfunción se observa principalmente en el tejido adiposo blanco asociándose a la hipertrofia de los adipocitos, que genera la acumulación de lípidos y posteriormente da pauta a la aparición de resistencia a la insulina inducida por el sobrepeso y la obesidad, ocasionando a su vez un desequilibrio metabólico desde la producción de energía, respiración oxidativa, y la entrada de nutrientes (Gabrielsson B. *et al*. 2003).

En un estudio comparativo que realizaron a dos grupos de ratones unos obesos y otros delgados demostraron que la pérdida mitocondrial en el TAB se correlaciona con el

desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), siendo en el primer grupo donde se mostró que los niveles mitocondriales en los adipocitos pertenecientes al TAB derivados de las almohadillas de grasa pertenecientes al epidídimo son 50% más bajos a comparación del otro grupo (Gabrielsson D. *et al*, 2003). Más tarde un grupo de científicos mostraron en ratones diabéticos que existe una disminución de ADN mitocondrial, alteraciones en la red mitocondrial, así como de la β-oxidación, y sobre todo una reducción en el número y función mitocondrial en el TAB.

Gracias a esta evidencia concluyeron que la BM está comprometida en el TAB en modelos de ratones obesos resistentes a la insulina. A su vez se considera que la influencia de otros factores como a la edad, el sobrepeso u obesidad y DM2, provocan la reducción del contenido mitocondrial en adipocitos blancos maduros, siendo el sobrepeso y obesidad los principales causantes de alteraciones en la BM, deteriorando la fase de diferenciación de preadipocitos durante la expansión del tejido adiposo blanco.

Los estudios más recientes han mostrado una posible intervención terapéutica para mejorar la función mitocondrial, relacionando el TAB y el TAM, debido a que la presencia de adipocitos marrones dentro de los depósitos del tejido adiposo blanco se ha correlacionado con fenotipos metabólicos mejorado, por lo que podría inducirse al TAB un fenotipo similar al marrón con la finalidad de mejorar la biogénesis mitocondrial, ya que sería de gran interés para reducir la acumulación de grasa en el tejido adiposo (Gabrielsson D. *et al*, 2003).

Tomando en cuenta estos puntos se sugiere que el proceso de biogénesis mitocondrial durante el sobrepeso u obesidad sean considerados para el adecuado funcionamiento celular, con la finalidad de que las células puedan aumentan su masa mitocondrial, generando nuevas mitocondrias a través de estímulos externos (Valero T, 2014) un ejemplo de ello podría ser la adición de Omega-3.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sobrepeso, se caracteriza por el aumento de masa grasa corporal predisponiendo a la acumulación de más grasa, que tiende a dar como resultado la obesidad, causando principalmente un incremento de tejido adiposo blanco aumentando el tamaño y número de sus adipocitos, presentándose en procesos conocidos como hipertrofia e hiperplasia. La acumulación de adipocitos induce a alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina y dislipidemias, que se relacionan a su vez con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, teniendo también relación con la disfunción mitocondrial.

Los problemas metabólicos causados por el sobrepeso comienzan con la disfunción del tejido adiposo blanco que incluye una baja biogénesis y función mitocondrial, las mitocondrias son necesarias para el metabolismo celular además de establecer la diferenciación de los adipocitos blancos hacia un fenotipo de adipocitos pardos, la inducción de esta diferenciación representa una nueva estrategia terapéutica que podría beneficiar el tratamiento del sobrepeso y la posible disminución del TAB; hoy en día se conoce que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3 mejoran los trastornos metabólicos asociados al sobrepeso, además favorecen la oxidación de ácidos grasos y el proceso de biogénesis mitocondrial.

Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación: ¿La presencia de ácidos grasos Omega-3 contenidos en aceites comerciales comestibles, modificarán la biogénesis mitocondrial en cultivo primario de adipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo humano en la región abdominal?

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la biogénesis mitocondrial en cultivo primario de adipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo abdominal humano en presencia de aceites comerciales comestibles con ácidos grasos Omega-3.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

5.2.1 Proliferar cultivo primario de adipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo humano de la región abdominal.

5.2.2 Aislar de mitocondrias de los adipocitos mediante el kit "Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells Thermo Scientific ™".

5.2.3 Cuantificar del número de mitocondrias en presencia y ausencia de aceites comerciales comestibles empleando verde Janus.

5.2.4 Comparar de la efectividad de cada aceite comercial comestible con la relación a la biogénesis mitocondrial.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

ESTRATEGIA DE TRABAJO

Con el propósito de dar cumplimento a los objetivos trazados en la investigación, se llevó a cabo la siguiente metodología:

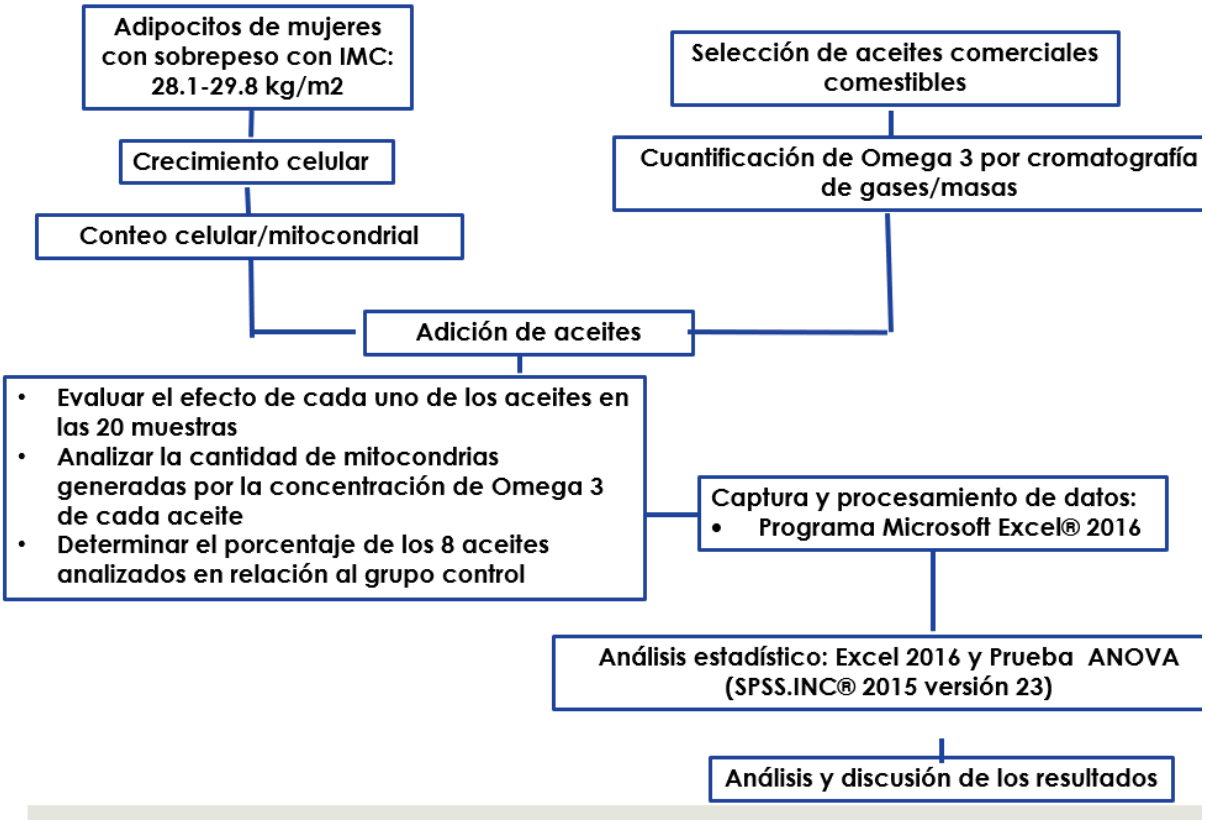


Figura 7. Esquema de estrategia de trabajo.

6.1.1 SELECCIÓN DE ACEITES

Se seleccionaron siete aceites de origen vegetal (aguacate, ajonjoli, cacahuate, chia, linaza, oliva y pepita de uva) y uno de origen animal (salmón noruego), con el objetivo de comparar la efectividad que tiene cada uno considerando que los aceites vegetales contiene ALA y el de salmón ALA, EPA y DHA. Los criterios a considerar fueron los siguientes:

Criterios de inclusión para los aceites vegetales:

a) Aceites que pueden consumirse en crudo, es decir directamente del envance a temperatura ambiente sin emplear un método de cocción a temperaturas superiores a los 100º C.
b) Aceites disponibles en supermercados del estado de Puebla.
c) Aceites comerciales comestibles que de acuerdo a la literatura contienen Omega-3 (Tabla 2) (Castro M, 2002)

Tabla 2. Contenido de ALA en aceites vegetales. Modificado de (Castro M., 2002)

CONTENIDO DE ALA (18:3) EN ACEITES VEGETALES g/100g		
Fuente	**ALA (18:3 Ω-3)**	**Criterios de selección e inclusión**
Aceite linaza	53.3	Aceites seleccionados disponibles en supermercados del estado de Puebla, empleados en crudo
Aguacate	0.96	
Ajonjolí	0.3	
Algodón, semilla	0.2	Aceites excluidos debido a que no se encuentran disponibles y se usan con otro fin terapéutico o cosmético.
Arroz integral	1.6	
Avena	1.79	
Canola	9.3-12.0	Aceites excluidios por uso en métodos de cocción
Cártamo	0.4	
Coco	0.22	Aceite excludio ya que se encuentra en estado sólido
Colza	10.9	Aceite excluido, no disponible en supermercados
Girasol	0.09-0.19	Aceite excluidio por uso en métodos de cocción
Grosella amarilla	19-20	Aceite excluido, no se encuentran disponibles en supermercados
Grosella negra	12-14	
Maíz	0.7-2.1	Aceites excluidos no disponibles en supermercados
Mostaza	5.9	
Nuez	10.4	Aceite excluido por uso terapéutico o cosmético
Oliva	0.54-0.6	Aceite seleccionado, disponible y por uso en crudo
Soya hidrogenada	2.6	Aceite excluido, no se encuentran disponibles en supermercados
Semilla uva	0.1	Aceite seleccionado, disponible y por uso en crudo

Criterios de exclusión de aceites vegetales:

a) Aceites que se emplean con fines terapéuticos o cosméticos.
b) Aceites que generalmente se emplean pasando por temperaturas superiores a los 100º C.
c) Aceites sólidos o semisólidos.
d) Aceites no disponibles en supermercados del estado de Puebla.

En la tabla 3 que se presenta a continuación, se encuentra las etiquetas de los aceites empleados, así como la marca, número de lote y supermercado en donde se adquirieron. Cabe mensionar que la mayoría de los aceites son de la marca Inés, ya que esta marca es la que oferta en Puebla una mayor variedad de aceites comestibles.

Tabla 3. *Información de los aceites comerciales comestibles empleados.*

ACEITE	ETIQUETA FRONTAL	INFORMACIÓN NUTRIMENTAL
ACEITE DE AGUACATE • **Marca: Ahuecatlán** • **Lote: 14217MA1232** • **Supermercado: City Market Puebla**		
ACEITE DE AJONJOLÍ EXTRA VÍRGEN • **Marca: Inés** • **Lote: 1056** • **Supermercado: Superama Puebla**		

ACEITE DE CACAHUATE • **Marca: Inés** • **Lote: 0985** • **Supermercado: Mega Puebla**		
ACEITE DE CHÍA EXTRA VÍRGEN • **Marca: Inés** • **Lote: 0744** • **Supermercado: Mega Puebla**		
ACEITE DE LINAZA • **Marca: Inés** • **Lote: 1037** • **Supermercado: City Market Puebla**		
ACEITE DE OLIVA • **Marca: San Lucas** • **Lote: 3617** • **Supermercado: Mega Puebla**		

ACEITE DE PEPITA DE UVA • **Marca: Carbonell** • **Lote: 71199** • **Supermercado: Mega Puebla**		
CÁPSULAS DE OMEGA 3 ACEITE DE SALMÓN NORUEGO • **Marca: Promega 3** • **Lote: 0619** • **Supermercado: Farmacias Guadalajara Puebla**		

De los aceites empleados únicamente el aceite de Chía extra virgen presenta en su etiqueta el contenido de Omega 3, por lo que fue necesario solicitar la cuantificación de Omega-3 que incluye ácido alfa linolénico (ALA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicopentaenóico (EPA) por medio de cromatografía de gases/masas.

6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE OMEGA 3 EN LOS ACEITES COMERCIALES COMESTIBLES

Los ácidos grasos pueden identificarse y cuantificarse empleando la técnica analítica de cromatografía de gases/masas de acuerdo al método descrito en (Muriuki, 2011), la cual nos indica la concentración de los diferentes ácidos grasos, la cuantificación se le solicitó al MC. Vladimir Carranza Téllez responsable del Laboratorio de GC/MS del ICUAP, utilizó el equipo Shimadzu (GCMS-QP2010), empleando como Standard Omega-3 de Sigma-Aldrich cat. No. NIST3275, con la finalidad de proporcionarnos la concentración de Omega 3 de los 8 aceites, debido a que el laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla no cuenta con dicho equipo. En la tabla 4 se muestran los valores de Omega-3 proporcionados de los aceites empleados.

Tabla 4. *Contenido de Omega 3 de la cuantificación obtenida por cromatografía de gases/masas.*

ACEITES	OMEGA 3
Aguacate	0.07 µg/µl
Ajonjolí extra virgen	0.05 µg/µl
Cacahuate	0.000092 µg/µl
Chía extra virgen	0.37 µg/µl
Linaza	0.15 µg/µl
Oliva	0.05 µg/µl
Pepita de uva	0.07 µg/µl
Cápsulas de Omega 3	0.304 µg/µl

El Omega-3 contenido en los aceites se extrajo con metanol para su identificación usando un sistema GC-MS acoplado con un espectrómetro de masas inerte con un detector de triple eje, en una columna HP-5 columna Agilent J & W GC (30 m x 0,32 mm, id. Con un espesor de película de 0,25 µm). Se empleo como gas acarreador helio, a una velocidad de 1,2 ml / min, y el volumen de inyección fue de 1 µL. La temperatura del puerto de inyección fue de 300° C, y el voltaje de ionización fue de 70eV. Los espectros se registraron con un escaneó cada segundo en un rango de 45-800 (m / z). El programa de temperatura del horno se inició a 50°C y se ajustó durante 5 min, aumentó a 320°C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min, y finalmente se mantuvo durante 20 min extra. La temperatura del puerto de inyección fue de 280°C, y la temperatura de la interfa fue de 300 °C. El tiempo de retardo del disolvente fue de 7 minutos para eliminar el pico de disolvente. Los espectros obtenidos se interpretaron comparándolos con los datos de la Biblioteca de espectros de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, EE. UU).

6.1.3 CRECIMIENTO CELULAR

Los adipocitos empleados en este trabajo fueron proporcionados por el Dr. José Luis Ventura Gallegos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, de la sede del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y son provenientes de 20 biopsias de mujeres con sobrepeso (IMC: 28.1-29.8 kg/m^2), de 19 a 25 años. Los adipocitos fueron entregados en crioviales para su propagación. Para manipular los adipocitos se empleó una campana de flujo laminar vertical modelo ESCO (Laminar flow cabinet), con filtro HEPA. Los adipocitos se crecieron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Sigma, Número de cat. D5648-10L adicionado con suero fetal bovino al 10% marca Biowest con número de cat. S1810-500. En una incubadora de CO_2 Forma Steri-Cycle de Thermo Scientific modelo 370.

Las células se crecieron hasta confluencia, como se describe a continuación:

1. Las células se recibieron congeladas en un criovial.
2. Se descongelan y se centrifugan por diez minutos a 1,500 rpm. Se retirará el sobrenadante que contiene principalmente suero fetal bovino y DMSO al 10%.
3. Después se resuspenden en 2 ml de medio de cultivo DMEM no suplementado y se centrifugan nuevamente, la pastilla resultante se resuspende en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y se colocan en una caja de cultivo T-25.
4. Después se incuban a 37°C en una atmosfera de CO_2 en aproximadamente 12 horas, las células se van adhiriendo a la superficie de la caja y comienzan a proliferar alrededor de 72 horas alcanzan confluencia, el medio se cambia cada 24 horas.
5. Las células se incuban hasta alcanzar 80%.
6. Una vez que han alcanzado confluencia se tripsinizan para despegarlas y contarlas.

6.1.4 CONTEO CELULAR

Se utiliza azul tripano para la diferenciación de las células vivas de las muertas, tomándose como células muertas las teñidas de azul y las no teñidas como vivas se cuentan en una cámara de Neubauer, como se describe a continuación.

1. Cuando las células alcanzan la confluencia se tripsinizan, para despegar a las células de la caja de cultivo.

2. Se elimina el medio de cultivo y las células se lavan tres veces con PBS 1X colocando 2 ml de PBS, en la caja enjuagando la superficie en donde se encuentran las células para quitar el exceso de medio y posteriormente se aspira el PBS para desecharlo, el procedimiento se repite 3 veces, de esta forma se elimina el suero del medio ya que podría contener algún inhibidor de tripsina.
3. Una vez que las células fueron lavadas, se les añade 2 ml de tripsina 1X. Se enjuagan moviendo horizontalmente de forma suave para cubrir toda la superficie por 1 min.
   3.1 Posteriormente la caja se incuba por cinco min a 37ºC, en una atmosfera de CO_2 al 5%.
   3.2 Pasados 5 minutos, las células se observan al microscopio con el fin de determinar si van perdiendo adherencia, de no ser así se incuban nuevamente, hasta máximo 30 min.
   3.3 Una vez que la mayoría de las células se han despegado se adicionan 5 ml de medio DMEM sin suero, para detener la digestión con tripsina.
   3.4 Las células se resuspenden en el medio pipeteando de arriba y abajo, por toda la superficie del frasco. Tratando de colocar todas las células en una esquina del frasco resuspendiendo continuamente para evitar se formen conglomerados de células, posteriormente se transfieren a un tubo para centrífuga estéril de 15 ml.
   3.5 El frasco se enjuaga nuevamente con 5 ml de medio de cultivo DMEM, repitiendo el punto anterior.
   3.6 Las células recolectadas se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos.

La pastilla se resuspende en 2 ml de medio de cultivo. Se toman 10 µL para realizar el conteo, y se depositan en un tubo para microcentrífuga con 90µL de azul tripano para la diferenciación de las células vivas de las muertas, tomándose como células muertas las teñidas de azul y las no teñidas como vivas (Dilución 1:10). Se cuentan en una cámara de Neubauer los cuatro cuadros de 4x4 obteniendo las células totales (vivas y muertas) con la finalidad de tener una cantidad específica (Estándar Operating, 2008). Las siguientes ecuaciones nos permiten obtener: células totales, células vivas y células por ml.

$$\boldsymbol{Células\ por\ ml} = \frac{\text{Cuenta total de células vivas}}{\text{Número de cuadros 4x4 evaluados}} X\ 10,000$$

$$\boldsymbol{Células\ totales} = \text{células por ml } X\ volmen\ (en\ ml)\ total\ del\ cual\ fueron\ extraidas\ las\ células\ evaluadas$$

$$\boldsymbol{Viabilidad\ celular}\ (\%) = \frac{\text{Numero de celulas vivas totales}}{\text{Número de células totales (vivas + muertas)}} X\ 100$$

6.1.5 CONTEO MITOCONDRIAL

Se empleó el Mitochondrial isolation Kit de ThermoFisher Scientific Cat. No. 89874 para asilar las mitocondrias de diferentes cantidades de adipocitos 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 y 5,000 células y posteriormente cuantificarlas empleando verde Janus. El colorante verde Janus B es un colorante vital que se emplea para teñir mitocondrias, su reducción y oxidación muestra la alteración de la cadena de transferencia de electrones y por lo tanto detecta la presencia de mitocondrias funcionales, la cantidad de mitocondrias se calcula de acuerdo a la absorbancia a 540/595 nm, de acuerdo con (Ghazi- Khansari, M *et al*. 2009; Ahmad, F *et al*. 2018).

El método de extracción de mitocondrias emplea centrifugación diferencial por gradiente de concentración, el fabricante no indica lo que contienen los reactivos por lo que se indica como reactivo A, B y C. A continuación, se desglosa el procedimiento:

1. A los Reactivos A y C, se les añaden inhibidores de proteasas.
2. Las células se centrifugan a 2,000 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla. Una vez que se obtuvo la pastilla se retiró con cuidado el sobrenadante.
3. A la pastilla se le adicionan 80 µL de reactivo A. Se mezcla en vórtex a velocidad media durante 5 segundos y se incuba en hielo durante no más de 2 minutos.
4. Se adiciona 1.0µL del reactivo B. Se agita en vórtex a velocidad máxima durante 5 segundos.
5. Se incuba en hielo durante 5 minutos, se agita en vórtex a velocidad máxima cada minuto.

6. Se agregan 800µL de reactivo de aislamiento de mitocondrias C. Se mueve lentamente el tubo varias veces para mezclar sin vortexear.
7. Se centrifuga el tubo a 700 ×g durante 10 minutos a 4 ° C.
8. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 2,0 ml y se centrifuga a 12,000 ×g durante 15 minutos a 4 °C, pasado el tiempo de incubación se centrifuga a 3000 ×g durante 15 minutos.
9. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica se transfiere a otro tubo y la pastilla que contiene las mitocondrias aisladas se resuspende en 500µL de reactivo C se centrifuga a 12,000 ×g por 5 minutos. La pastilla con las mitocondrias se mantiene en hielo hasta su cuantificación. La cuantificación de proteínas de la fracción enriquecida de mitocondrias se realizó mediante el método de Bradford, expresándose en µg proteína mitocondrial/células.

Cuantificación Mitocondrial con Verde Janus

El verde Janus B es 8 - [[4- (dimetilamino) fenil] diazenil] -N, N-dietil-10-fenilfenazin-10-ium-2-amina es un colorante catiónico lipófilo supravital. Al igual que otros cationes lipófilicas, es absorbido solo por mitocondrias metabólicamente activas en cuyo potencial de membrana negativo interno está intacto (Chen LB 1987 y Ross MF *et al.* 2005).

Debido a esta propiedad, el verde Janus se ha utilizado ampliamente para evaluar la pureza, integridad y actividad metabólica de las mitocondrias con métodos basados en microscopía (Todd AS et al, 1988; Stephanova et al, 2008). En su forma oxidada el verde Janus tiene un color azul verde y tiene una absorbancia máxima a 595 nm. Tras la reducción por las deshidrogenasas mitocondriales, el verde Janus es convertido en dietilsafranina que es de color rosa y tiene una absorbancia máxima a 550 nm (Showacre JL, 1953). La actividad de deshidrogenasa está asociada con el daño y disfunción mitocondrial, por lo tanto, la capacidad de las enzimas para convertir al verde Janus en dietilsafranina se puede usar como un indicador de la función mitocondrial.

6.1.6 ADICIÓN DE ACEITES COMERCIALES COMESTIBLES

En una placa de 96 pozos de marca TPP con número de cat. 20170015, se colocaron 5,000 células por pozo, se realizaron experimentos por duplicado de cada una de las 20 muestras de adipocitos, dos cajas por cada muestra, se adicionó a cada placa 0, 5, 10, 15, 20 y 25 µL

de emulsión de aceite, la emulsión estable se realizó con aceite y medio DMEM, mediante sonicación a 200 W, 25 kHz por 15 min en un equipo Branson CPX lo que nos permitió mantener una emulsión estable hasta ponerla en contacto con las células, en todos los casos se empleó el mismo volumen de aceites independientemente de su concentración de Omega-3, la cual iba aumentando a la par con los µL de emulsión de aceites. A continuación, se muestra en las siguiente tabla el volumen correspondiente con la concentración de Omega 3 de cada uno de los aceites. Se incubaron durante 24 horas, para posteriormente determinar el número de mitocondrias.

OMEGA 3 (µg/µl)								
VOLUMEN (µl)	**AGUACATE**	**AJONJOLÍ**	**CACAHUATE**	**CÁPSULAS DE OMEGA 3**	**CHÍA**	**LINAZA**	**OLIVA**	**PEPITA DE UVA**
5	0.35	0.25	0.00046	1.52	1.85	0.75	0.35	0.35
10	0.7	0.5	0.00092	3.04	3.7	1.5	0.5	0.7
15	1.05	0.75	0.00138	4.56	5.55	2.25	0.75	1.05
20	1.4	1	0.00184	6.08	7.4	3	1	1.4
25	1.75	1.25	0.0023	7.6	9.25	3.75	1.25	1.75

OMEGA 3 (µg/µl)	
VOLUMEN (µl)	**CÁPSULAS DE OMEGA 3**
5	1.52
10	3.04
15	4.56
20	6.08
25	7.6

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

1. En placas de 96 pozos se sembraron 5,000 adipocitos en cada pozo de cada una de las 20 muestras, dos cajas por muestra.
2. Se colocaron de 0 a 25 µl de la emulsión de aceites, de acuerdo al siguiente esquema:

	A	B	C	D	E	F
1	0 µl Aguacate	5µl Aguacate	10µl Aguacate	15 µl Aguacate	20 µl Aguacate	25 µl Aguacate
2	0 µl Ajonjolí	5µl Ajonjolí	10µl Ajonjolí	15 µl Ajonjolí	20 µl Ajonjolí	25 µl Ajonjolí
3	0 µl Cacahuate	5µl Cacahuate	10µl Cacahuate	15 µl Cacahuate	20 µl Cacahuate	25 µl Cacahuate
4	0 µl Chía	5µl Chía	10µl Chía	15 µl Chía	20 µl Chía	25 µl Chía
5	0 µl Linaza	5µl Linaza	10µl Linaza	15 µl Linaza	20 µl Linaza	25 µl Linaza
6	0 µl Oliva	5µl Oliva	10µl Oliva	15 µl Oliva	20 µl Oliva	25 µl Oliva
7	0 µl Pepita de uva	5µl Pepita de uva	10µl Pepita de uva	15 µl Pepita de uva	20 µl Pepita de uva	25 µl Pepita de uva
8	0 µl Cápsulas	5µl Cápsulas	10µl Cápsulas	15 µl Cápsulas	20 µl Cápsulas	25 µl Cápsulas

3. Las células se incubaron durante 24 horas con los diferentes aceites a 37ºC con una atmósfera de 5% de CO_2.
4. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS1X y se les adicionaron 40 µl de verde Janus 10 µM, se incubaron durante 4 horas.
5. Pasado el tiempo de incubación se leyó la absorbancia a 550 y 595 nm.
6. Los resultados se graficaron considerando los microgramos de proteínas de las mitocondrias purificadas contra la concentración de Omega-3 de los diferentes aceites.

6.1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

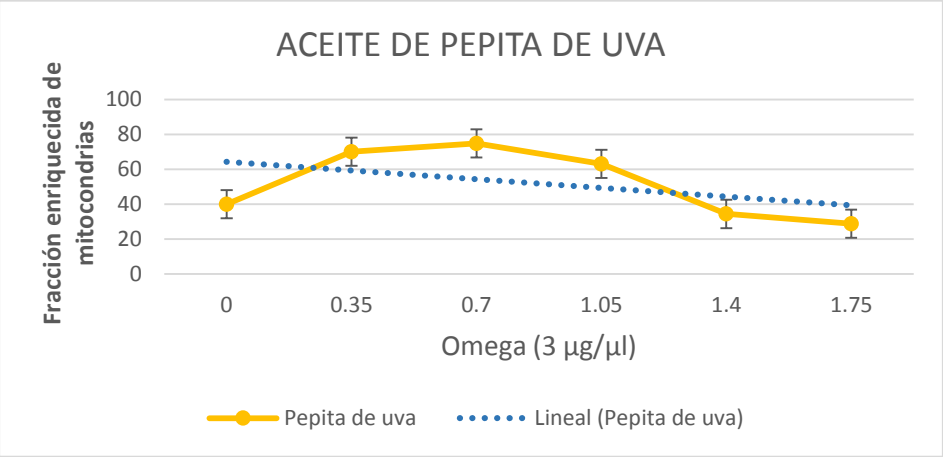
Para el análisis estadístico se elaboró una base de datos en el programa Excel 2016 para Windows. Posteriormente se usó el programa de cómputo Statistical Package for the Social Sciences (SPSS.INC®) 2015 versión 23. Se aplicó la siguiente prueba: ANOVA con comparación de medias entre más de dos grupos con intervalo de confianza del 95%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto de aceites comerciales comestibles sobre la biogénesis mitocondrial, los cuales se adicionaron a cultivo primario de adipocitos provenientes de tejido adiposo subcutáneo humano de la región abdominal provenientes de 20 cirugías bariátricas de mujeres con sobrepeso (IMC: 28.1-29.8 kg/m^2) de entre 19-25 años.

Se determinó el efecto de los aceites en las veinte muestras en la biogénesis mitocondrial. Posteriormente se realizó el promedio de cada una de las muestras con los diferentes aceites los resultados obtenidos se compararon con lo reportado en la literatura, como se describe a continuación.

En el caso del aceite de pepita de uva presentó un comportamiento diferente a los demás aceites, observándose una aparente disminución de la biogénesis mitocondrial conforme aumentaba la concentración, lo que podría asociarse al alto contenido de ácido linoleico (65%), este ácido es precursor de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos mediadores proinflamatorios, induciendo más que una disminución del número de mitocondrias una disfunción mitocondrial (Pardo J.E. *et al*, 2009).

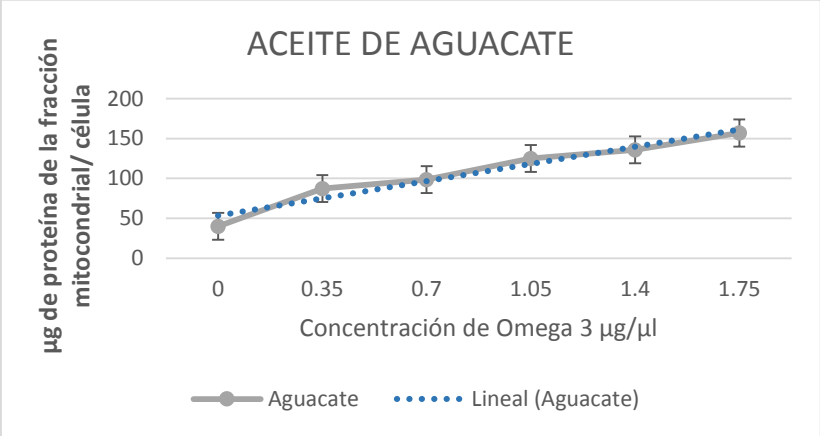


Ácidos grasos	Concentración (mg/µl)
Palmítico	0.07387
Linoleico	0.61492
Oleico	0.16928
Linolénico	0.00294

Tabla 5.Composición de ácidos grasos del aceite de pepita de uva. Modificado de (Pardo J.E. *et al*, 2009)

Figura 8. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega-3 en el aceite de pepita de uva.

En cuanto al aceite de aguacate observamos que a pesar de poseer bajas concentraciones de Omega 3, indujo la biogénesis mitocondrial de acuerdo a su composición posee ácido oleico y vitamina E, el ácido oleico de acuerdo favorece la completa oxidación de ácidos grasos a través de la activación de SIRT- PGC-1α, lo que de forma indirecta induce la biogénesis mitocondrial y la vitamina E (Souza T. *et al*, 2015, Hong J. *et al*, 2013).

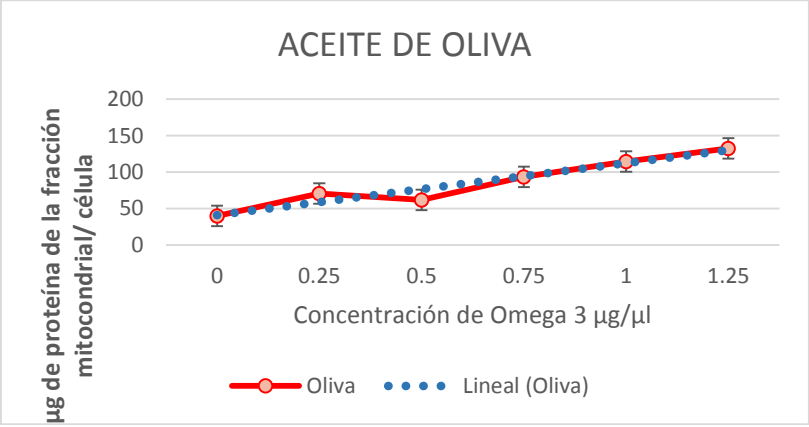


Ácidos grasos	Concentración (mg/µl)
Palmítico	0.17827
Oleico	0.50205
Linoleico	0.12129
α-Linolénico	0.00761
Otros componentes	
Vitamina E	0.30754

Tabla 6.Composición de ácidos grasos del aceite de aguacate. Modificado de (Hong J. *et al*, 2015)

Figura 9. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de aguacate.

El aceite de oliva fue otro de los aceites vegetales que presentó bajas concentraciones de Omega-3 de acuerdo a la cromatografía de gases/masas confirmando dicha información reportada por Azadmard, S. 2007; siendo el ácido oleico el que mayor proporción tiene y como se discutió anteriormente este podría ser el ácido que influyó en nuestra investigación.

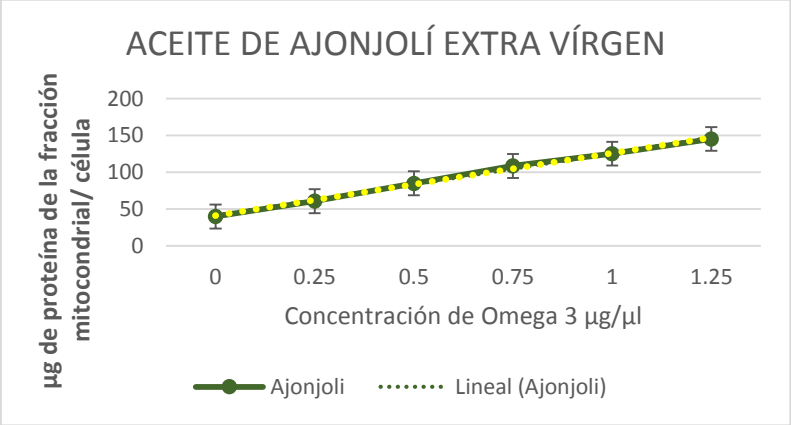


Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.1278
Oleico	0.8878
Linoleico	0.1702
α-Linolénico	0.1136

Tabla 7 .Composición de ácidos grasos del aceite de oliva. Modificado de (Azadmard S. *et al*, 2007)

Figura 10. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de oliva.

En el caso del aceite de ajonjolí extra virgen se observa que de acuerdo a los datos reportados por Gharby S. *et al*, 2017 y a la cromatografía presenta en bajas proporciones ácido α-linolénico, por lo que se deduce que a este ácido no se le atribuye al efecto que se generó en el estudio, siendo nuevamente el ácido oleico el que predomina en su composición.

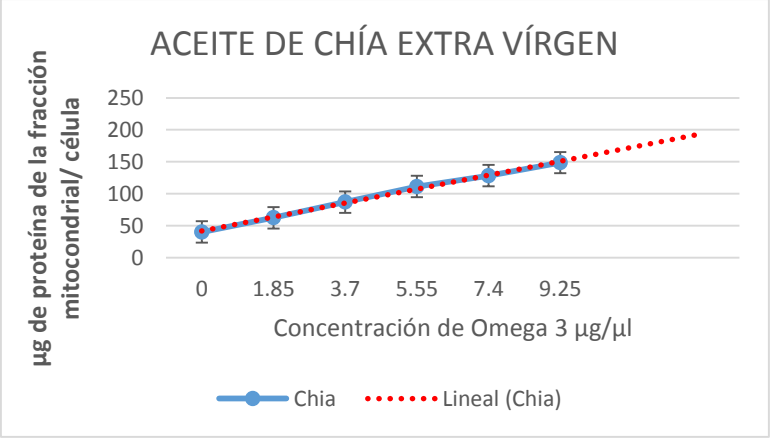


Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.10384
Oleico	0.38506
Linoleico	0.38689
α-Linolénico	0.00183

Tabla 8 .Composición de ácidos grasos del aceite de ajonjolí. Modificado de (Gharby S. *et al*, 2017)

Figura 11. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de ajonjoli.

El aceite de chía fue uno de los aceites vegetales que tanto de los datos correspondientes a la concentración obtenida por cromatografía y a los reportados por Ding Y. *et al*, 2018; en su composición presentó una elevada concentración de ácido α- linolénico, siendo este el que definitivamente contribuyó de forma favorable la activación de la biogénesis mitocondrial, viéndose en la gráfica un aumentó en los µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula



Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.07449
Oleico	0.23054
Linoleico	0.20068
α-Linolénico	0.53162

Tabla 9. Composición de ácidos grasos del aceite de chía. Modificado de (Ding Y. *et al*, 2018)

Figura 12. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de chía..

De acuerdo a la composición del aceite de linaza fue el ácido α- linolénico el que predomina (Mirela V. *et al*, 2012), siendo el influyente principal en la respuesta a la biogénesis mitocondrial generada en nuestra investigación, por ello en la figura se muestra un aumento de µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula de forma continua a la par con la concentración empleada.

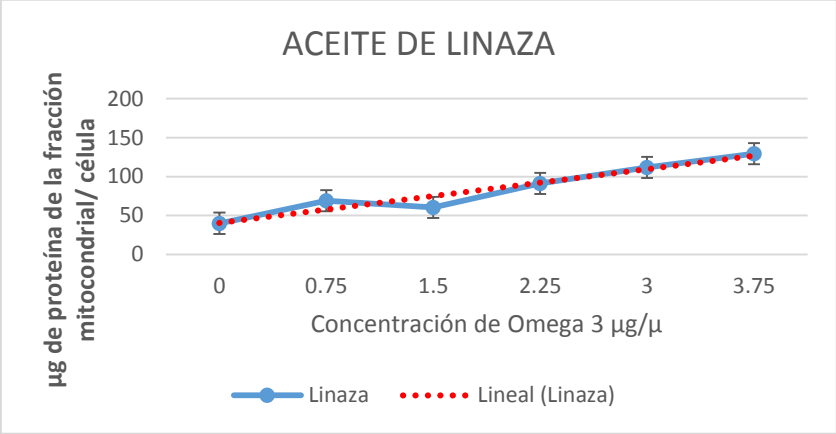


Figura 13. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de linaza.

Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.06102
Oleico	0.17168
Linoleico	0.15999
α-Linolénico	0.49352

Tabla 10.Composición de ácidos grasos del aceite de linaza. Modificado de (Mirela V. *et al*, 2012)

En el caso de las cápsulas de Omega 3 siendo las únicas de origen animal provenientes de salmón, también presentaron altas concentraciones de Omega 3 de forma natural respecto a la cromatografía de gases/masas, y realizando una comparación con composición del aceite reportado por Conchillo, A. et al. 2006, se observa que el a pesar de que el ácido α-linolénico se expresa solo es bajas proporciones, siendo el EPA y DHA, los que están generando el efecto esperado en nuestra investigación.

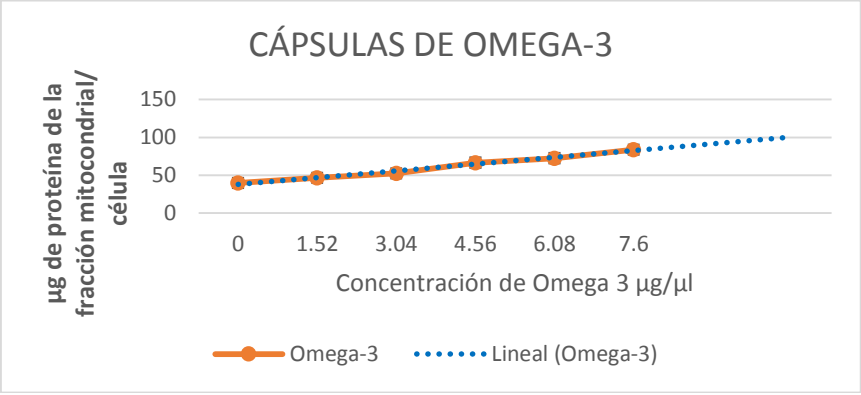


Figura 14. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de cápsulas de Omega 3.

Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.1367
Oleico	0.1878
Linoleico	0.0632
α-Linolénico	0.06324
EPA	0.0716
DHA	0.1348

Tabla 11 .Composición de ácidos grasos de cápsulas de Omega 3. Modificado de (Conchillo A. *et al*, 2006)

Finalmente en el caso del aceite de cacahuate a pesar de poseer las concentraciones más bajas a comparación de los demás aceites vegetales, presentó un incremento en los µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula conforme iban aumentando las concentraciones, y de acuerdo al análisis científico de los componentes del aceite reportado por Anyasor, G.N. *et al*, 2009, se puedo concretar que la actividad del aceite de cacahuate se efectúa por el contenido de ácido α-linolénico que posee a pesar de que se presenta en bajas proporciones trabajando a la par con el ácido oleico, siendo éste el que favorece la completa oxidación de ácidos grasos a través de la activación de SIRT1- PGC1α lo que de forma indirecta activa la biogénesis mitocondrial.

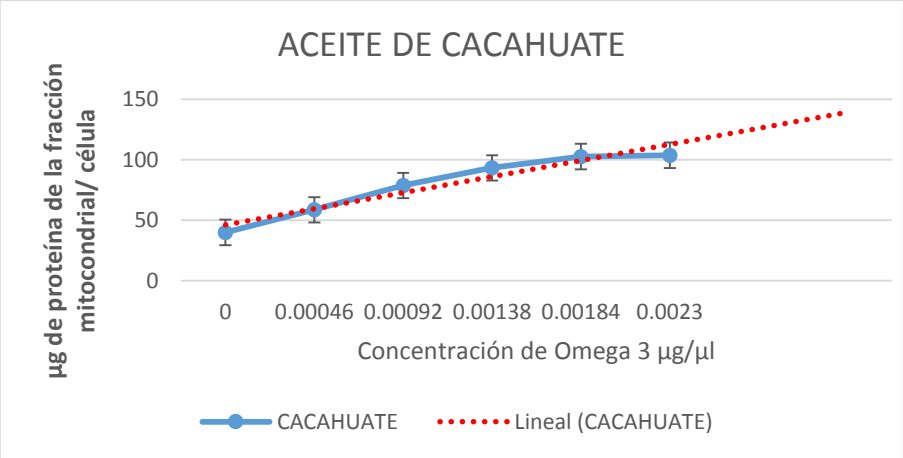


Figura 15. µg de proteína de la fracción mitocondrial/ célula generada por cada concentración de Omega 3 en el aceite de pepita de uva.

Ácidos grasos	Contenido mg/µl
Palmítico	0.0398
Oleico	0.3889
Linoleico	0.8184
α-Linolénico	0.0012

Tabla 12.Composición de ácidos grasos del aceite de cacahuate. Modificado de (Anyasor G.N. *et al*, 2009)

En la siguiente figura se muestra una comparación de siete aceites comerciales comestibles crudos de origen vegetal también tomando en cuenta una cápsula de salmón, con relación al grupo control, es decir a un grupo de adipocitos al que no se les adicionó ningún aceite, con el fin de determinar el incremento en porcentaje que generó cada uno de ellos, tomando al grupo control como el 100%, siendo el aceite de aguacate el que sobrepaso el porcentaje hasta casi 400%, seguido del de chía , oliva y ajonjolí, sin embargo de acuerdo a lo discutido anteriormente el aceite de cacahuate a pesar de ser el aceite que presentó concentraciones más bajas de Omega 3, aun así rebaso al grupo control.

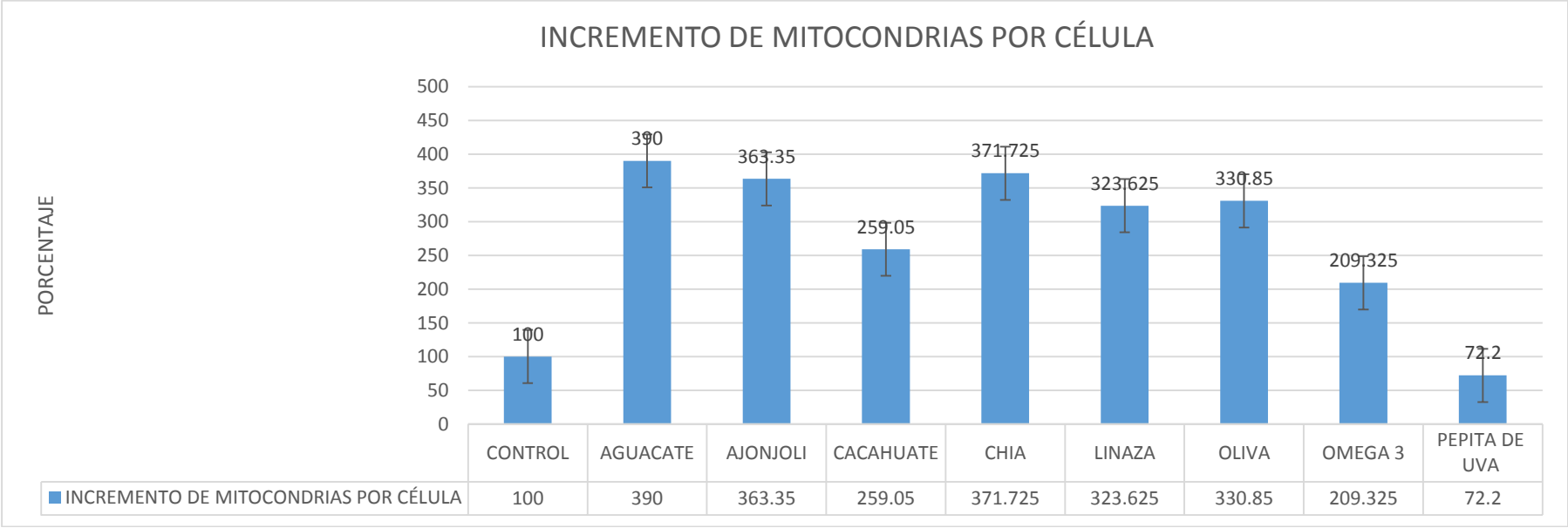


Figura 16. Porcentaje de incremento de mitocondrias con relación al grupo control. Porcentaje alcanzado de los 8 aceites comerciales comestibles empleados en la investigación con respecto al grupo control, es decir a los adipocitos que no se les adicionó ningún aceite.

Para corroborar los resultados se realizó una observación microscópica usando un microscopio invertido digital marca AmScope t380 C-m con cámara incluida con salida de USB 2.0 para mostrar en la computadora, usando el objetivo 100x, para observar de forma cronológica desde la adición de la emulsión de los aceites hasta la presencia de mitocondrias en los adipocitos en cultivo (Figura 17-20).

- En la figura 17 se observa en tiempo 0, es decir, la adición de la emulsión de los aceites a las células.
- En la figura 18, pasando 8 horas de la adición se observa el ingreso de los aceites a los adipocitos.
- En la figura 19, pasando 12 horas se determina la presencia del aceite en el interior de las células adiposas.
- Y finalmente en la figura 20, a las 24 horas ya se puede observar la presencia de mitocondrias (flechas blancas) en el adipocito (flechas negras).

Cabe mencionar que los adipocitos blancos fueron adquiriendo características de adipocitos beige por la presencia de mitocondrias que se generaron con la adición de los aceites empleados.

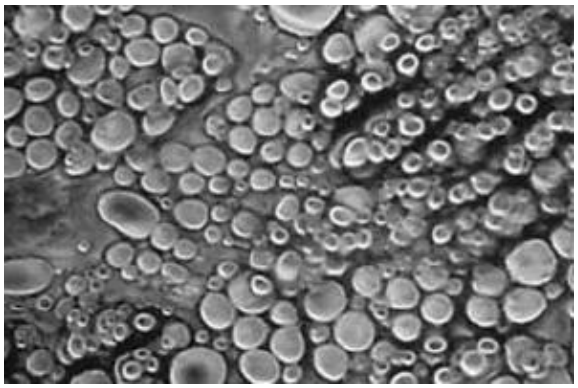


Figura 17. Emulsión de aceites adicionado a las células en tiempo 0

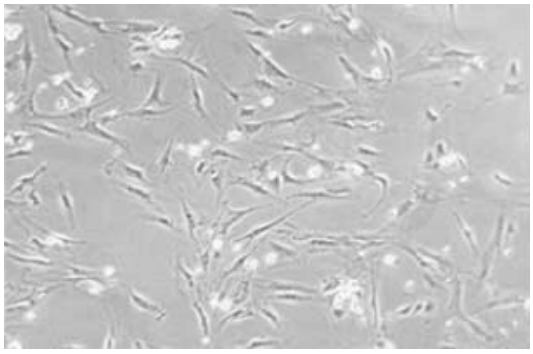


Figura 18. Ingreso de aceites en células adiposas a las 8 horas

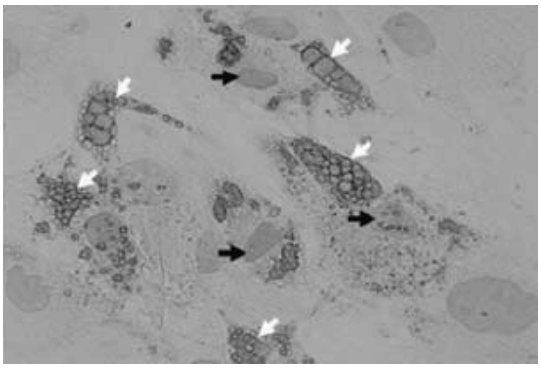


Figura 19. Presencia de aceite en el interior del adipocito a las 12 horas

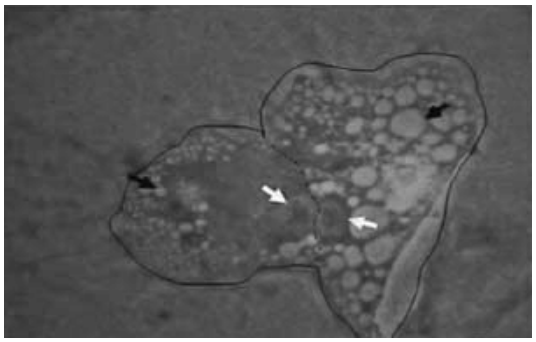


Figura 20. Presencia de mitocondrias en el adipocito después de las 24 horas (flechas blancas), las vacuolas lipídicas se muestran en flechas negras.

Durante nuestra investigación pudo haber factores que influyeran en nuestros resultados como la actividad física, peso y el tipo de dieta que llevaban las pacientes de las que se obtuvieron los adipocitos ya que se desconoce esta información debido a que no se cuenta con la historia clínica. Aparte uno de los factores descartados completamente fue la temperatura de los aceites que se emplearon a temperatura ambiente, y mantuvieron sus componentes nutricionales ya embasados, ya que si estos se hubieran sometido a temperaturas arriba de 100ºC hubieran modificado sus componentes (Suaterna, A. C. 2009).

Cabe destacar que los resultados que fueron reportados con relación a la concentración de Omega-3, corresponden en conjunto al ácido α-linolénico, EPA y DHA, ya que así fueron proporcionados por la cromatografía de gases/masas y con base a esos datos arrojados se esperaba que nuestros resultados se vieran potenciados con las cápsulas de salmón por ser el que posee mayor concentración de forma natural y de acuerdo a lo reportado en la literatura los pescados son los que contienen en mayor cantidad EPA y DHA, los cuales como se comentó inducen la biogénesis mitocondrial, sin embargo, de acuerdo a nuestra investigación los que generaron un efecto positivo cumpliendo nuestro objetivo fueron seis aceites vegetales a pesar de presentar menor concentración de Omega 3.

Haciendo un análisis más detallado con relación a la composición de ácidos grasos de cada uno de los aceites reportados por diferentes autores, se pudo determinar que el ácido graso que influyo en la biogénesis mitocondrial fue el ácido α-linolénico, por ejemplo en el caso del aceite de chía extra virgen y el de linaza, en el aso de los aceites de aguacate, oliva, ajonjolí y cacahuate fue el ácido oleico y finalmente en el de pepita de uva el ácido linoleico.

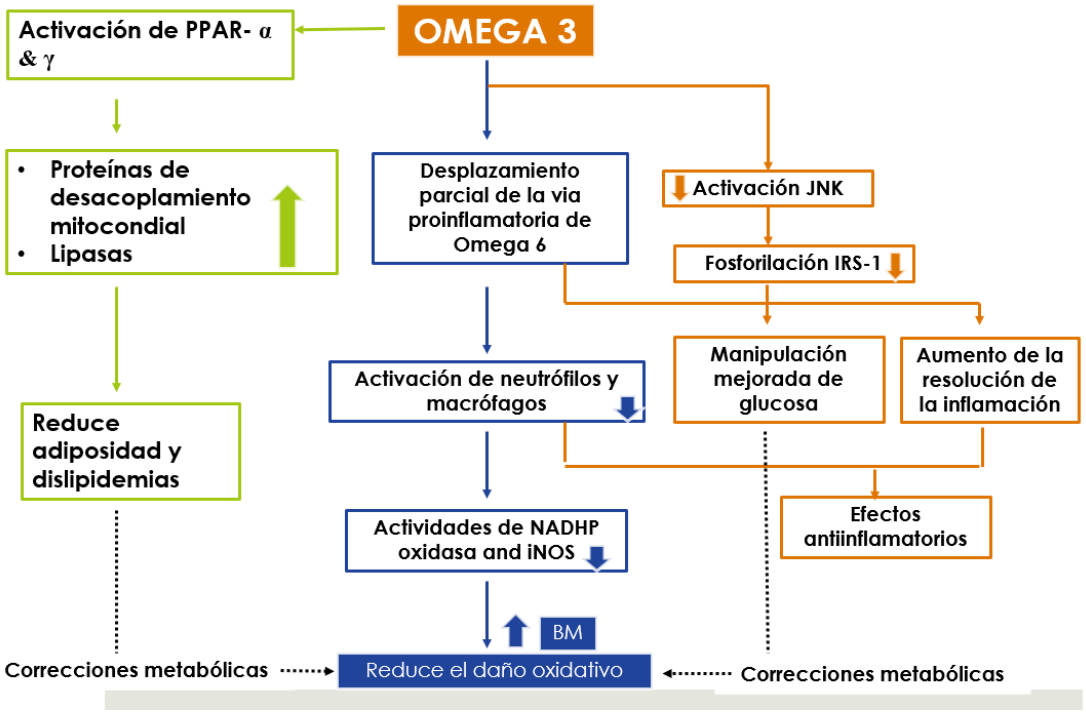


Figura 6. Mecanismo de acción de Omega 3. Papel antiinflamatorio del Omega 3 en el metabolismo, dando como resultado la reducción del daño oxidativo.

8.CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos los componentes de cada aceite participan en la inducción de biogénesis mitocondrial, no únicamente el ácido α-linolénico, EPA o DHA, sino también otros àcidos grasos como el oleico, que fue el que predomino en la mayoría de los aceites vegetales que se emplearon, no descaratando la participación de los ácidos grasos antes mencionados, como lo fue en el de chía, que fue el aceite que presento mayor concentración de ácido α-linolénico.

De acuerdo al análisis científico de los componentes de cada uno de los aceites empleados, se sabe que aademás del Omega 3 que contienen de forma natural, otro componente que está induciendo la biogénesis mitocondrial, es el ácido oleico, participando en la oxidación completa de los ácidos grasos. Respecto al efecto que tienen los aceites comerciales comestibles en la biogénesis mitocondrial, se observó que los aceites que presentaron un incremento favorable fue el aceite de aguacate incrementando casi 400% con relación al grupo control, seguido del aceite de chía extra virgen aumentando 371%, el de ajonjolí extra virgen con un 363% y el aceite de oliva con un 330%. Mientras que el aceite queposiblemente dio lugar a una disfunción mitocondrial con respecto al grupo control fue el aceite de pepita de uva, atribuyéndole este comportamiento al ácido linoleico, conllevándolo a un proceso inflamatorio ocasionando una posible disfunción mitocondrial

La adición de los ácidos grasos Omega 3 de origen vegetal mejoran los perfiles metabólicos y reducen el daño oxidativo en la mitocondria, favoreciendo el proceso de biogénesis mitocondrial, siendo así una estrategia terapéutica que podría contribuir a la disminución de tejido adiposo blanco incrementando el número mitocondrial, dando lugar a una transición a tejido adiposo beige.

9. PERSPECTIVAS A FUTURO

Se recomienda en un futuro realizar un análisis de los resultados de la cromatografía de gases/masas de cada uno de los aceites seleccionados para conocer todos los componentes que contiene de manera natural además del Omega-3, que pudieran estar relacionados con la biogénesis mitocondrial, también se considera relevante analizar los cambios metabólicos que se efectúan en los adipocitos, además de los marcadores moleculares que se expresan en el tejido adiposo beige y marrón durante en el proceso de transición para monitorearlos.

Lo ideal sería determinar si mezclando algunos de estos aceites entre si pudiera potenciar el efecto que se evaluó en nuestro estudio, debido a que posiblemente la combinación entre componentes como antioxidantes que contienen de forma natural contribuyan a un cambio positivo en otros perfiles metabólicos.

Otro análisis que resultaría interesante a futuro seria la aplicación de estos aceites en adipocitos de personas con diferentes grados de obesidad, para observar el comportamiento de estos y determinar si hay un efecto similar a la que se obtuvo en los adipocitos de personas con sobrepeso.

10. BIBLIOGRAFÍAS

1. Afshordel, S., Hagl, S., Werner, D., Rohner, N., Kogel, D., et al. (2015). Omega- 3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging- Impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. Prostaglandins leukot essent fatty acids, 92:23-31.

2. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, et al. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature.*382* (6588), 250-252.

3. Bonet M.L, Oliver P., Palou A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. Biochim Biophys Acta (1831), 969–85.

4. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. (2005). Insulin resistance in nondiabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. Diabetologia. *48*(4), 634-642.

5. Cabezas, C., Hernández, B., Vargas, M. (2016). Effects on health and global regulation. Rev. Fac. Med. 64(4), 761-768.

6. Cao, Y. (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. J Clin Invest. *117*(9):2362-8.

7. Cappa, D. (2012). Tejido adiposo: Anatomía y estructura básica. Instituto de Educación fisica Dr. Jorge E. Coll. PubliCE. Disponible desde: https://g-se.com/tejido-adiposo-anatomia-y-estructura-basica-1479-sa-r57cfb2721bbee.

8. Carvajal, O., Nolasco, C., Aguilar, M.G., et al. (2014). Effect of dietary intake of avocado oil and olive oil on biochemical markers of liver function in sucrose-fed rats. Biomed Res Int.1-8

9. Castellanos, L. y Rodriguez, M. (2015). El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. Rev Chil Nutr, 42 (1), 90-95.

10. Castro, M. I. (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. Interciencia, *27*(3), 128-136.
11. Chattopadhyay M., Khemka V,K., Chatterjee G., et al. (2015) Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. Mol Cell Biochem, *399*(1-2), 95-103.
12. Duarte, A., Boroni, A.P., Macedi V., Goncalves, R., et al. (2014). Regular intake of high- oleic peanuts improves fat oxidation and body composition in overweight/obese men pursing a energy- restricted diet.Obesity,22 (6), 1422-1429.
13. Esteve, M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. Endocrinol Nutr, *61*(2), 100-112.
14. Ezquerro, S., Frühbeck, G. y Rodríguez A. (2016). El tejido adiposo, protagonista en las alteraciones metabólicas de la obesidad. SEBBM, 23-28.
15. Fernández, G.M., Pérez, M.P., Prieto, P.L., Sainz, N., López Y, M., Houssier M, et al. (2014). Alpha-lipoic acid reduces fatty acid esterification and lipogenesis in adipocytes from overweight/obese subjects. Obesity (Silver Spring), 22:2210–2215.
16. Fernández, G.M., Pérez, M.P., Prieto-Hontoria, P.L., Houssier, M., Burrell, M.A., Langin, D., et al. (2015). Alpha-lipoic acid treatment increases mitochondrial biogénesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. Biochim Biophys Acta, (1851):273–81.
17. Fernández, G.G., Romero, T.B., Troya, E.V., y Arraiz C. (2016). La Adiponectina, una adipocina del tejido adiposo clave en la obesidad durante la adolescencia. Enfermería Investiga, Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión, *1*(4), 169-175.
18. Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal N, et al. (2005) Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. Diabetologia, *48*(11):2365-75.
19. Fock, K.y Khoo, J. (2013). Diet and exercise in management of obesity and overweight. J Gastroenterol Hepatol, *4*:59-63.

20. Gabrielsson, B., Johansson, J., Lonn, M., Jernas, M., Olbers, T., Peltonen M. et al. (2003). High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. Obes Res, *11*(6), 699-708.

21. Garavaglia, J., Markoski, M., Oliveira, A. y Marcadenti, A. (2016). Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. Nutrition and Metabolic Insights, 9, 59–64.

22. Gargallo, M., Breton, M., Basulto, M., et al. (2012). Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevencion y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (concenso FESNAD-SEEDO). La dieta en el tratamiento de la obesidad (III/III). Nutricion Hosp, *27* (3), 833-869.

23. Ghazi- Khansari, M., Mohammadi- Bardbori, A., & Hosseini, M. J. (2009). Using Janus green B to study paraquat toxicity in rat liver mitochondria: role of ACE inhibitors (thiol and nonthiol ACEi). Annals of the New York Academy of Sciences, *1090*(1), 98-107.

24. Gil, A., y Sánchez, A. (2010). Metabolismo Lipídico Tisular. En: A, Gil, ed., Tratado de Nutrición. Tomo I. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición., 2ª ed. Madrid: Medica Panamericana, pp.277-301/ 445.

25. González, O., Hernández, J.F., Salazar, A. et al. (2013). Efecto de la suplementación de omega 3 sobre IMC, ICC, y composición corporal en mujeres obesas. Archivos latinoamericanos de nutrición, 63 (3), 224-231.

26. González, H.F., y Visentin, S. (2016). Nutrientes y neurodesarrollo: Lípidos. Actualización. Arch Argent Pediatr, *114*(5), 472-476.

27. Heinonen S., Buzkova J., Muniandy M., Kaksonen R., Ollikainen M., Ismail K, et al. (2015). Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. Diabetes.

28. Hunter, J. E. (1989). Omega-3 fatty acids from vegetable oils. In Dietary ω3 and ω6 Fatty Acids (pp. 43-55). Springer, Boston, MA.

29. Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, et al. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. Science, *281*(5373):64-71.

30. Jeromson, S y Hunter, D. (2014). Influencing mitochondrial membrane composition and bioenergetics through omega 3 supplementation. The Journal of Physiology, 592 (9): 1912-1914.

31. Katz, M., Cappelletti, M., Kawior, I., Aguirre, M., et al. (2013). Documento de concenso sobre el abordaje nutricional del paciente con sobrepeso y obesidad sociedad Argentina de nutrición. Actualización en nutrición, 14 (1), 8-18.

32. Kobayashi, M., Fujii, N., Narita, T. y Higami, Y. (2018). SREBP-1c-Dependent Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue by Caloric Restriction. Int. J. Mol. Sci, 19 (3335). 1-11.

33. Kopeck J, Rossmeisl M, Flachs P, *et al*. (2009). N-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. Proceedings of the Nutrition Society. 68: 361-369.

34. Laiglesia, L.M., Lorente, S., Prieto, P.L., Fernández, M., et al. (2016). Eicosapentaenoic acid promotes mitochondrial biogenesis and beige- like features in subcutaneous adipocytes from overweight subjects. Journal of Nutritional Biochemistry 37: 76-82.

35. Lepretti, M., Martucciello, S., Burgos, A., Putti, R. y Lionetti, L. (2018). Omega 3 fatty acids and insulin resistence: focus on the regulation of mitochondria and endoplasmic reticulum stress. Nutrients, 10 (3): 1-20.

36. Lorente, C., Costa, A., Navas, S., Zabala, M. y Moreno, M. (2013). Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. J Physiol Biochem, 69 (3): 633-651.

37. Luna, P., Flores, P. y Martinez, M. (2014). Las mitocondrias como blanco terapéutico. Rev Mexicana de anestesiología, 37 (4): 283-296.

38. Martínez, L., Laiglesia L.M., Huerta A.E., Martínez J.A., Moreno, A, MJ. (2015). Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. Prostaglandins Other Lipid Mediat.

39. McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, et al. (2011) Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? Diabetes, *60*(1):47-55.

40. Montalvo, C.E. (2010). Tejido Adiposo. Biología celular e histología médica. Universidad Nacional Autónoma De México. Facultad De Medicina.

41. Muir, L., Neeley, C., Meyer, K., Baker, N., et al. (2016). Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hiperplasia: correlations with diabetes un human obesity. Obesity (Silver Spring), *24* (3): 597-605.

42. Muriuki, M. W., Dumancas, G. G., Purdie, N., & Reilly, L. (2011). Quantification of Total omega-6 and omega-3 Fatty Acids and omega-6/omega-3 Ratio in Human Serum Using GC-MS. LC GC NORTH AMERICA, *29*(1), 60-+.

43. Nagy, K y Tiuca, D.I. (2017). Importance of Fatty Acids in Physiopathology of Human Body. INTECH.3-20.

44. Ortiz, G y Hernández, H. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias y Guia de tratamiento farmacfarmacológicos dislipidemias para el primer nivel de atención. Rev. Mex Cardio, 24(S1):3-22.

45. Pan, J.H., Kim, M.J., Kim, J.H., et al. (2015). Inhibition of the Lipogenesis in Liver and Adipose Tisuue of Diet-induced obese C57BL/6 mice by feeding oleica cid-rich sesame oil. Food Sci.Biotechnol, 24 (3), 1115-1121.

46. Patton, K y Thiboudeau, G. (2017). The Human Body in Health & Disease. 7th ed. Canada: Elsevier. P535.

47. Poudyal, H., Panchal, S., Diwan, V. y Brown, L. (2011). Omega-3 fatty acids and metabolic síndrome: Effects and emerging mechanism of action. Progress in Lipid Research, 50. 372-387.

48. Reyes, M. (2012).Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. Rev. Med Clin, *23*(2), 136-144.

49. Rodríguez ,C. P., González, M. C., Aguilar, C.A., Nájera, O. (2017). Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. Investigación Clínica, *58*(2), 175-196.

50. Sánchez, J.C., Romero, C.R., Muñoz, L. V., y Rivera, R. A. (2016). El órgano adiposo, un arcoíris de regulación metabólica y endocrina. Revista Cubana de Endocrinología, *27*(1), 105-119.
51. Sanhueza, J., Durán, S., y Torres, J. (2015). Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. Nutrición Hospitalaria, *32* (3), 1362-1375.
52. Shichun, D., Jin, J., Wenjun, F. y Qing, S. (2015). Does fish oil have an anti-obesity effect in overwieght/obese adults? A meta-analysis of randomized controlled trials. Plos one. 10 (11), 1-20.
53. Showacre, J.L. (1953). The supravital staining with Janus green B of mitocondria in the retinal rods of the guinea-pig eye. Exp Cell Res, 5 (2): 554-556.
54. Silva, R., Alves, S., Aguilar, E. y Maróstica, M.R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (Salvia hispánica L.) in diet-induced obese rats. Food Research International. 76 (3), 666-674
55. Simopoulos, A.P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. Nutrients ,*8* (128), 1-17.
56. Smitka, K., y Marešová, D. (2015). Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. Prague Medical Report, *116*(2), 87-111.
57. Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina UASLP. (2008). Conteo celular y evaluación de viabilidad.
58. Stepanova, A., Hoyt, R., Yun, J., Benavente, L. et al. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell, 133 (1): 177-191.
59. Stinkens, R., Brouwers, B., Jocken, J.K. et al. (2018). Exercise training-induced effects on the abdominal subcutaneous adipose tissue phenotype in obese humans. Journal of Applied Physiology. 4-18.
60. Surendra, S y Mali, A.V.(2016). Omega-3 fatty acids and mitocondrial functions. Keys to nutritional health. 229-233.
61. Tourniaire F., Musinovic H., Gouranton E., Astier J., Marcotorchino J., Arreguin A., et al. (2015). All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitocondria biogenesis in adipocytes. J Lipid Res, 56, 1100–1109.

62. Valenzulea, R, Tapia, G., Gónzalez, M. y Valenzuela A. (2011). Ácidos Grasos Omega-3 (EPA Y DHA) y su Aplicación en Diversas Situaciones Clínicas. Rev Chil Nutr Vol, 38 (3), 356- 367.

63. Valero, T. (2014). Mitochondrial Biogénesis: Pharmacological Approaches. Current Pharmaceutical Design. 20 (35),5507-5509.

64. Vaughan, R., García, R., Bisoffi, M., Conn, C. y Trujillo, K, (2012). Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis an metabolism in skeletal muscle cells. Lipids in health and disease, 11:142

65. Vilallonga, L., Repetti, M. y Delfante, A. (2008). Tratamiento de la obesidad. Abordaje nutricional. Rev. Hosp. Ital. B. Aires, *28* (2), 1-8.

66. Vissers, D., Hens W., Taeymans J., Baeyens J.P., Poortmans J., et al. (2013).The Effect of Exercise on Visceral Adipose Tissue in Overweight Adults: A Systematic Review and MetaAnalysis. Plos On, *8* (2), 1-10.

67. World Health Organization. (2018). Obesidad y Sobrepeso. (18 de febrero 2018) de World Health Organization Sitio web: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.

68. Zhou, X., Wu, W., Chen, J., Wang, X. y Wang, Y. (2015). AMP- activated protein kinase is required for the anti-adipogenic effects of alpha-linonelic acid.Nutrition & Metabolism, 12 (10), 2-8.

11. ANEXOS

Anexo 1

PREPARACIÓN DE PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

1. Preparar 100 ml de Ácido Clorhídrico 1M (1M HCI) agregando 8.62 ml de HCI concentrado a 91 ml de dH_20 previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 ml. **No agregar el agua al acido.** Mezcle en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos. Afore a 100 ml con dH_20.
2. Preparar 100 ml de hidróxido de Sodio 10 M (10M NaOH) agregando 40 g de NaOH a 40 ml de dH_20 previamente colocados en un vaso de precipitado de 250 ml. Mezclar con una barra magnética en una plancha agitadora hasta que el NaOH se haya disuelto por completo. Afore a 100 ml con dH_20.
3. Añadir las sales a un vaso de precipitado adecuado para el volumen de la solución por preparar.
4. Añadir el 80% del volumen de dH_20 requerido y mezcle encima del agitador magnético hasta diluir las sales
5. Ajustar el pH a 7.4 con 1 M HCI o 10 m NaOH (según sea necesario) empleando para ello un a pipeta de transferencia de plástico mientras se monitorea el pH. Añadir las soluciones de HCI o NaOH gota a gota.
6. Afore la solución con dH_20 al volumen final requerido.
7. Filtre la solución a través de unidades de filtración o discos de 0.45 µm para eliminar partículas suspendidas.
8. Esterilizar en autoclave.
9. Dentro del gabinete de seguridad biológica (GSB) y bajo técnica aséptica, distribuya alícuotas de 50 ml, en tubos cónicos esterilizados.
10. Almacenar a temperatura ambiente o bajo refrigeración entre 4 y 8°.

PREPARACIÓN DE COLORANTES

Rojo oleoso

Este tipo de colorante se encarga de teñir diversas secciones del tejido para mostrar si existe presencia de grasa o lípidos.

Se realiza una solución madre:

- Se pesan .05 gr del colorante rojo oleoso y se disuelve en 100 ml de isopropanol al 98%
- Se deja reposar esta solución durante 24 horas.
- Posteriormente se toman 6 ml de la solución madre y se disuelven con 4 ml de agua destilada, se filtra y se deja reposar 10 a 15 min.
- Y esta solución final será la final

Azul de Metileno

El azul de metileno es un tipo de colorante capaz de teñir tanto tejidos como células muertas. Como tal no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas integras, por lo que solo se encarga de evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación. (31)

El uso de este colorante si es fundamental para diferenciar las células muertas de las vivas junto con sus membranas integras.

Se mostro que, al añadir este colorante en mitocondrias, estas parecían mas amplias de lo habitual, por lo que facilita aún más la diferenciación (30)

Se realiza una solución madre:

- Se pesan 0.02 g del colorante azul de tripán.
- Se disuelve en 100 ml de agua destilada.
- Se procede a filtrar.
- Y esta solución final será la final.

Verde de Janus

El Verde Janus B, se ha utilizado como tinción para mitocondrias.

Este tipo de colorante se encarga de teñir todas las partes de la célula, sin dañarla, se absorbe en su totalidad. Para que se lleve a cabo esta reacción va a depender del oxígeno, y conforme transcurre el tiempo, en partes no mitocondriales la coloración se va reduciendo por el oxígeno que se va eliminando.

Las observaciones de las mitocondrias teñidas con este colorante van a depender de las actividades enzimáticas de la célula

Se realiza una solución madre:

- ❖ Se pesan .05 gramos del colorante verde de Janus y se disuelve en 100 ml de isopropanol al 98%
- ❖ Se deja reposar esta solución durante 24 horas
- ❖ Posteriormente se toman 6 ml de la solución madre y se disuelven con 4 ml de agua destilada, se filtra y se deja reposar 10 a 15 min.
- ❖ Y esta solución final será la final

Anexo 2

PREPARACIÓN DE SOLUCION CELULAR O PBS 1X (1 litro)

1. Pesar reactivos:
    - NaCl 80 gr
    - KCl 2 gr
    - Na_2HPO 14.4 gr
    - KH_2PO_4 2.4 gr
2. Colocar reactivos en vaso de precipitado de 1 L y colocar 30-40 ml de agua inyectable hasta disolver completamente, ayudando con un agitador. Ir agregando más agua poco a poco hasta llegar a medio litro con forme se van disolviendo los reactivos.
3. Pasar a matraz de aforación de 1 litro y aforar.
4. Pasar a frasco estéril de vidrio con rosca.
5. Medir pH usando el pHmetro, hasta llegar a 7.3.
6. Esterilizar la solución en autoclave. Se debe dejar el frasco medio abierto.
7. Una vez estéril, se obtiene una solución madre PBS 10x.
8. Para obtener PBS 1x se debe diluir 100 ml de solución madre con 900 ml de agua inyectable.

Anexo 3

Ejemplo de caja de micro titulación.

En la imagen siguiente se observa cómo es una caja de 96 pozos con azul de metileno, van colocando las muestras para la microtitulación y el grupo Blanco y el grupo control y la

división entre las células cultivadas en medio control y medio adicionado con aceites esenciales.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	B	M	M	M	M	M	M	M				
B	B	M	M	M	M	M	M	M				
C	B	M	M	M	M	M	M	M				
D	B	M	M	M	M	M	M	M				
E	B	M	M	M	M	M	M	M				
F	B	M	M	M	M	M	M	M				
G	B	M	M	M	M	M	M	M				
H	B	M	M	M	M	M	M	M				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	M	M	M	M	M	M	M				
B	B	M	M	M	M	M	M	M				

En la siguiente imagen se observa cómo es una caja de 96 pozos con rojo oleoso, van colocando las muestras para la microtitulación y el grupo Blanco y el grupo control y la división entre las células cultivadas en medio control y medio adicionado con aceites esenciales.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	B	M	M	M	M	M	M	M				
B	B	M	M	M	M	M	M	M				

C	B	M	M	M	M	M	M	M				
D	B	M	M	M	M	M	M	M				
E	B	M	M	M	M	M	M	M				
F	B	M	M	M	M	M	M	M				
G	B	M	M	M	M	M	M	M				
H	B	M	M	M	M	M	M	M				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	M	M	M	M	M	M	M				
B	B	M	M	M	M	M	M	M				

Anexo 6
ACEITES COMERCIALES COMESTIBLES

ACEITE	MARCA COMERCIAL	ºLOTE
Pepita de uva	Carbonell	71199
Cacahuate	Inés	0985
Ajonjolí extra virgen	Inés	1056
Linaza	Inés	1037
Chía extra virgen	Inés	0744
Aguacate	Ahuecatlán	14217MA1232
Oliva	San Lucas	3617
Cápsulas de Omega 3	Promega 3	0619